

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie



Bc. Kristýna Hlavačková

Molekulární identifikace flebotomů

Molecular identification of phlebotomine sand flies

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Vít Dvořák, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 8. 2014

.....
Kristýna Hlavačková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Vítkovi Dvořákovi, za jeho trpělivost, vedení a četné připomínky k této práci. Veliké díky patří též Honzovi Votýpkovi, za pomoc se zpracováním množství sekvencí a tvorbou fylogenetických stromů, a stejně tak Petrovi Haladovi, za změření spousty vzorků a jejich následného vyhodnocení. Děkuji také Petrovi Volfovi, že jsem mohla během svého studia pracovat právě v jeho laboratoři a svým přátelům, kteří mi poradili či mě pobavili, když bylo potřeba. Navíc bych velmi chtěla poděkovat všem členům své rodiny, kteří mi vždy splnili vše, co mi na očích viděli.

SEZNAM ZKRATEK

EF-1 α - elongační faktor 1 α

COI - cytochrom oxidáza I

Cyt b - cytochrom b

ITS2 - vnitřní přepisový mezerík 2

MALDI-TOF MS - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

ND4 - podjednotka 4 NADH dehydrogenázy

SSU - malá ribozomální podjednotka

VCL - viscerální leishmanióza

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se věnuje identifikaci zástupců rodů *Phlebotomus* a *Sergentomyia* z podčeledi Phlebotominae. Druhy rodu *Phlebotomus* se podílí na přenosu virových a bakteriálních infekcí, spolu se zástupci novosvětského rodu *Lutzomyia* jsou také jedinými prokázanými přenašeči parazitických protozoí rodu *Leishmania*. Druhy rodu *Sergentomyia* přenáší prvoky sesterského rodu *Sauroleishmania*, který infikuje plazy, ale již dlouhou dobu se objevují spekulace o jeho možném zapojení do přenosu savčích leishmanií. Tato podezření pramení zejména z opakovaných nálezů savčích leishmanií v jejich trávicím traktu.

Přesné druhové určení medicínsky důležitých zástupců hematofágního hmyzu je naprosto zásadní, mimo jiné k efektivnímu nastavení jejich kontroly. Rutinní určování flebotomů je založeno na morfologických znacích umístěných především na hlavě a genitáliích. Tyto znaky však podléhají vnitrodruhové variabilitě, jejich hodnocení vyžaduje určitou míru zkušenosti a u volně chycených jedinců mohou být poničené, což znemožňuje určení do druhu. Tato práce proto představuje dvě alternativy identifikace flebotomů na základě molekulárních znaků. První z nich je DNA-barcoding, přístup založený na sekvenční analýze určitého DNA markeru a jeho porovnání s databází, který se dnes již běžně používá k určování řady skupin organismů. Druhou metodou je MALDI-TOF MS, které se hojně využívá v klinické identifikaci bakterií a od nedávna i k určování mnohobuněčných organismů. Současně s aplikací těchto metod je diskutován jejich přínos a případné nedostatky.

Zpracované vzorky flebotomů pocházejí jak z našich laboratorních kolonií, tak z terénních sběrů zaměřených na lékařsky významné druhy rodu *Phlebotomus* z oblasti Středomoří a druhy rodu *Sergentomyia* z endemických i neendemických oblastí Etiopie.

Klíčová slova: DNA-barcoding, MALDI-TOF MS, morfologické určování, Phlebotominae, *Phlebotomus*, *Sergentomyia*

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on species identification of sand flies belonging to two genera of the subfamily Phlebotominae, genus *Phlebotomus* and *Sergentomyia*. Genus *Phlebotomus* together with the genus *Lutzomyia* of New World include the only proven vectors of *Leishmania* parasites and they are also carriers of viral and bacterial infections. Species of the genus *Sergentomyia* are proven vectors of sister genus *Sauroleishmania* that infects reptiles, but for several decades there have been speculations about their possible involvement in the transmission of mammalian *Leishmania* species. These suspicions arise mainly from repeated findings of mammalian *Leishmania* parasites in their digestive system.

Correct species determination of medically significant hematophagous arthropods is very important especially for purposes of epidemiological studies so that efficient vector control may be correctly set. Routine identification of sand flies is based on morphological characters located mainly on their heads and genitalia. However, these characters may be variable within a species, they require certain expertise and in the field samples they may be damaged, making proper species identification impossible. This thesis therefore presents two alternatives of sand fly identification based on molecular characters. The first is DNA-barcoding, an approach based on sequencing analysis of a consensual gene marker and its comparison with a database, which is nowadays commonly used for species determination of different groups of organisms. The second method is MALDI-TOF MS protein profiling, widely used for clinical identification of bacteria and recently also applied on various multicellular organisms. Along with the application of these methods, the benefits and possible drawbacks are discussed.

Processed samples of sand flies come both from our laboratory colonies and from field collections with focus on medically important *Phlebotomus* species from the Mediterranean region and *Sergentomyia* species from endemic and non-endemic regions of Ethiopia.

Key words: DNA-barcoding, MALDI-TOF MS, morphological identification, Phlebotominae, *Phlebotomus*, *Sergentomyia*

OBSAH

1 ÚVOD.....	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1 Obecná charakteristika podčeledi Phlebotominae (čeleď Psychodidae)	2
2.2 Onemocnění přenášená rody <i>Phlebotomus</i> a <i>Sergentomyia</i>	3
2.3 Morfologie a životní cyklus flebotomů.....	5
2.4 Taxonomie podčeledi Phlebotominae.....	6
2.5 Rody <i>Phlebotomus</i> a <i>Sergentomyia</i>	12
2.5.1 Rod <i>Sergentomyia</i> (Franca <i>et</i> Parrot 1920).....	12
2.5.1.1 Vybrané druhy rodu <i>Sergentomyia</i>	13
podrod <i>Sintonius</i>	13
<i>Sergentomyia adleri</i>	13
<i>Sergentomyia clydei</i>	14
podrod <i>Parrotomyia</i>	14
<i>Sergentomyia africana africana</i>	15
<i>Sergentomyia eremitis</i>	15
<i>Sergentomyia magna</i>	16
podrod <i>Parvidens</i>	16
<i>Sergentomyia lesleyae</i>	17
podrod <i>Sergentomyia</i>	17
<i>Sergentomyia antennata</i>	17
<i>Sergentomyia schwetzi</i>	18
Formy <i>S. schwetzi</i>	19
2.5.2 Rod <i>Phlebotomus</i> (Rondani <i>et</i> Berte 1840)	20
2.5.2.1 Vybrané druhy rodu <i>Phlebotomus</i>	21
podrod <i>Adlerius</i>	21
<i>Phlebotomus arabicus</i>	21
podrod <i>Larrousius</i>	22
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	22
<i>Phlebotomus tobbi</i>	23
podrod <i>Phlebotomus</i>	23
<i>Phlebotomus papatasi</i>	23
podrod <i>Paraphlebotomus</i>	24
<i>Phlebotomus sergenti</i>	24
podrod <i>Euphlebotomus</i>	25
<i>Phlebotomus argentipes</i>	25
2.6 Použití molekulárních metod k identifikaci flebotomů	26
2.6.1 Metoda DNA-barcodingu	26
2.6.2 Metoda MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	28

ČÁST 1: IDENTIFIKACE DRUHŮ RODU <i>SERGENTOMYIA</i> POMOCÍ DNA-BARCODINGU	30
3.1 MATERIÁL A METODIKA	31
3.1.1 Sběr materiálu a jeho uchování.....	31
3.1.2 Zalévání preparátů a determinace flebotomů.....	31
3.1.3 Izolace DNA	38
3.1.3.1 Izolace DNA pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit.....	38
3.1.3.2 Solná extrakce DNA	38
3.1.4 Amplifikační reakce.....	39
3.1.5 Elektroforéza.....	43
3.1.6 Přečištění PCR produktu a sekvenační reakce.....	44
3.1.6.1 Přečištění PCR produktu pomocí High Pure PCR Product Purification Kit.....	44
3.1.6.2 Přečištění PCR produktu pomocí přesrážení etanolem.....	44
3.1.7 Analýza sekvencí, tvorba alignmentů.....	45
3.1.8 Konstrukce fylogenetických stromů	46
3.1.9 Pokusy s druhem <i>Sergentomyia schwetzi</i>	46
3.1.9.1 Autogenie samic <i>Sergentomyia schwetzi</i>	46
3.1.9.2 Partenogeneze samic <i>Sergentomyia schwetzi</i>	47
3.1.9.3 Vývoj larev <i>Sergentomyia schwetzi</i> při různých teplotách	47
4.1 VÝSLEDKY	48
4.1.1 Morfologické určení zástupců rodu <i>Sergentomyia</i>	48
4.1.2 Sekvenační analýza zástupců rodu <i>Sergentomyia</i>	52
4.1.2.1 Sekvenační analýza cytochrom oxidázy I.....	52
4.1.2.2 Sekvenační analýza cytochromu b	55
4.1.3 Pokusy s druhem <i>Sergentomyia schwetzi</i>	57
4.1.3.1 Vliv rozmnožování na morfologii dospělých samců	57
4.1.3.2 Vliv teploty během larválního vývoje na morfologii dospělých samců	57
5.1 DISKUZE	59
 ČÁST 2: IDENTIFIKACE DRUHŮ PODČELEDI PHLEBOTOMINAE POMOCÍ MALDI-TOF MS.	68
3.2 MATERIÁL A METODIKA	69
3.2.1 Chov flebotomů	69
3.2.2 Sběry flebotomů a jejich skladování.....	69
3.2.3 Příprava vzorků a matrice	70
3.2.4 Měření na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru, zpracování spekter a tvorba dendrogramů	71
3.2.5 Konstrukce fylogenetických stromů	72
4.2 VÝSLEDKY	73
4.2.1 Uchovávání a homogenizace vzorků	73
4.2.2 Proteinová spektra v rámci jednoho druhu	77
4.2.3 Proteinová spektra vybraných zástupců rodů podčeledi Phlebotominae	80
5.2 DISKUZE	86

6 ZÁVĚR	94
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	95
7.1 Primární citace	95
7.2 Sekundární citace	108
8 PŘÍLOHA.....	110
8.1 Tabulky kódů a morfologických určení zalitých zástupců	110

1 Úvod

Flebotomové (Diptera, Psychodidae) jsou zástupci krev sajícího hmyzu, kteří se uplatňují jako významní přenašeči onemocnění lidí i zvířat. Z těchto nákaz je nejdůležitější protozoární infekce, leishmanióza, jejímiž potvrzenými přenašeči jsou druhy z rodů *Lutzomyia* a *Phlebotomus*, spekuluje se o možném zapojení rodu *Sergentomyia*, který je přenašečem sesterského rodu *Sauroleishmania*.

Taxonomický systém zástupců podčeledi Phlebotominae je založen na klasifikaci morfologických znaků. Ty se ale během let ukázaly jako velmi nespolehlivé, jelikož vnitrodruhová variabilita flebotomů je vysoká, stejně jako výskyt mnoha druhových komplexů, kde jednotliví zástupci jsou morfologicky velice těžce rozpoznatelní. V posledních dvaceti letech proto postupně roste využití molekulárních metod k ujasnění taxonomické příslušnosti zkoumaných jedinců. V této diplomové práci jsem se zaměřila na identifikaci starosvětských druhů rodů *Phlebotomus* a *Sergentomyia* pomocí nových molekulárních postupů.

Zkoumaní zástupci rodu *Sergentomyia* pocházejí z terénních sběrů z ohnisek viscerální leishmaniózy na severu Etiopie, a z různých neendemických oblastí na jihu. Jedinci byli nejprve identifikováni dle morfologických znaků a posléze u vybraných z nich byly amplifikovány geny pro cytochrom oxidázu I a cytochrom b, na jejichž základě byly zkonstruovány fylogenetické stromy. Zvláštní pozornost pak byla věnována druhu *S. schwetzi*, u jehož samců bylo popsáno několik morfologických variet. Jde o druh známý sáním na savcích včetně člověka a zmiňovaný opakovaně v souvislosti s možnou rolí v přenosu lidské leishmaniózy.

Druhy z pěti podrodů rodu *Phlebotomus* a po jednom druhu z rodů *Lutzomyia* a *Sergentomyia* z laboratorních chovů i terénních sběrů byly podrobeny analýze metodou MALDI-TOF MS, a poprvé tak byla ukázána možnost aplikace tohoto postupu na zástupcích podčeledi Phlebotominae. Soustředili jsme se především na optimalizaci postupu a průkaz unikátnosti proteinových spekter studovaných druhů.

Kapitoly Materiál a metodika, Výsledky a Diskuze byly vzhledem k použití rozdílných metod pro přehlednost zpracovány zvlášť pro etiopské druhy rodu *Sergentomyia* a zvlášť pro flebotomy analyzované pomocí MALDI-TOF MS.

Cíle práce:

- morfologická identifikace zástupců druhu *Sergentomyia* z Etiopie
- využití metody DNA-barcodingu k určování etiopských zástupců rodu *Sergentomyia*
- fylogenetická studie etiopských druhů rodu *Sergentomyia*
- průkaz možnosti aplikace metody MALDI-TOF MS na zástupce podčeledi Phlebotominae
- optimalizace skladování a přípravy vzorků pro vyšetření pomocí MALDI-TOF MS

2 Literární přehled

2.1 Obecná charakteristika podčeledi Phlebotominae (čeleď Psychodidae)

Rody *Phlebotomus* a *Sergentomyia* řadíme do podčeledi Phlebotominae, která spadá do řádu Dvoukřídli (Diptera). Mezi zástupci tohoto řádu najdeme více než 150 tisíc druhů, jedná se o jednu z nejvíce morfologicky a biologicky rozrůzněných skupin (Yeates *et al.* 2007). Její zástupce můžeme rozdělit do dvou podřádů: Brachycera a Nematocera. Čeleď Psychodidae patří do podřádu Nematocera a infra-řádu Psychodomorpha, který zahrnuje plesiomorfni linie nižších dvoukřídli (Hall *et* Gerhardt 2009).

Zástupci nižších dvoukřídli se pravděpodobně vyvinuli během svrchního Permu před 220 miliony lety (Wiegmann *et al.* 2011) a čeleď Psychodidae pak během Křídy před 95 miliony let (Bertone *et* Wiegmann 2009).

Dnes spadá do čeledi Psychodidae asi 3000 druhů, dělících se do šesti podčeledí: Bruchomyiinae, Horaellinae, Phlebotominae, Psychodinae, Sycoracinae a Trichomyiinae (Duckhouse 1973). Zástupce této čeledi bychom díky široké morfologické a ekologické diverzitě našli na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy. Krev sající zástupce zahrnují však jen podčeledi Phlebotominae a Sycoracinae. Do podčeledi Psychodinae řadíme druhy obtížného hmyzu, ale larvy některých rodů (*Clogmina* a *Psychoda*) mohou působit myiáze a tím i zdravotní komplikace (Rutledge *et* Gupta 2009). Zbývající podčeledi, Bruchomyiinae, Horaellinae a Trichomyiinae, zahrnují pouze zástupce, kteří krev nesají a jsou tak z hlediska humánní či veterinární medicíny nevýznamní.

V podčeleď Phlebotominae najdeme přibližně 700 druhů, dělících se do šesti rodů: *Brumptomyia*, *Chinius*, *Lutzomyia*, *Phlebotomus*, *Sergentomyia* a *Warileya* (Seccombe, Ready *et* Huddleston 1993). Mezi nejdůležitější morfologické znaky, odlišující jednotlivé rody, patří morfologie hrudi, nohou a žilkování křídel. Obecně jsou zástupci podčeledi Phlebotominae považováni za druhy z tropických oblastí, ale obývají i jiné rozmanité biotopy mimo ně. Zástupce bychom našli ve většině Starého světa, od jižní Evropy přes Asii, Afriku, Austrálii a v Novém světě v centrální a jižní Americe, nevyskytují se však na Tichomořských ostrovech a na Novém Zélandu.

Druhy z Nového světa patří do rodů *Lutzomyia*, *Brumptomyia* a *Warileya*, z nichž medicínsky a veterinárně významné druhy najdeme jen v rodu *Lutzomyia*. Ve Starém světě se vyskytují druhy rodu *Phlebotomus* a *Sergentomyia*, oba v roli vektorů lidských i zvířecích onemocnění (Rutledge *et* Gupta 2009) a rod *Chinius*. Zástupci rodu *Phlebotomus* obývají oblast Mediteránu a pásmo od východní Afriky po východní Indii, zatímco rod *Sergentomyia*

najdeme ve Středomoří, subsaharské Africe a jihovýchodní Asii. Pouze tři druhy podčeledi Phlebotominae nalezneme v Austrálii; jeden náleží do podrodu *Australophlebotomus* a druhé dva do rodu *Sergentomyia* (Perfilijev 1968). Zástupce rodu *Chinius* najdeme v jihovýchodní Asii. Nejseverněji se flebotomové vyskytují v západní Kanadě (49° s. š.) *Lutzomyia vexator* (Shemanchuk, Robertson *et* Depner 1978) a v Německu (50° s. š.) *P. mascitti* (Melaun *et al.* 2014). Nejjižněji dle literatury zasahují zástupci flebotomů ke 40° j. š. (Perfilijev 1968). V nejvyšší nadmořské výšce (3300 m n. m.) se pravděpodobně vyskytuje *P. rupester* v Afganistánu (Killick-Kendrick 1999). Zástupci podčeledi Phlebotominae nejsou příliš dobří letci a létají spíše na krátké vzdálenosti několika stovek metrů, což přispívá spolu s dalšími faktory k mozaikovitosti jejich výskytu (Senghor *et al.* 2011).

2.2 Onemocnění přenášená rody *Phlebotomus* a *Sergentomyia*

Flebotomové se podílejí na přenosu infekčních onemocnění virového, bakteriálního i protozoárního původu. Do tohoto přenosu jsou zapojeny jen samice, jelikož samci nesají krev. Rody *Lutzomyia* a *Phlebotomus* přenášejí původce onemocnění u lidí a zvířat a rody *Brumptomyia*, *Sergentomyia* a *Warileya* u zvířat (Rutledge *et* Gupta 2009). Úspěšnost sání samic závisí především na látkách obsažených v jejich slinách a imunitní odpovědi hostitele. Proteinové složení slin je druhově specifické, ale záleží i na pohlaví a fyziologickém stavu flebotoma (Volf, Tesarova *et* Nohynkova 2000). Látky obsažené ve slinách posléze brání hemostázi a zánětlivé reakci hostitele, ale mohou u něj vyvolat alergickou reakci (Belkaid *et al.* 2000).

Rody *Phlebotomus* a *Lutzomyia* jsou zapojeny do přenosu nespecifického horečnatého onemocnění známého jako flebotomí horečka. Viry, které ji působí, patří do rodu *Phlebovirus* a byly izolovány právě ze zástupců zmíněných rodů, příliš se proto s tímto onemocněním nesetkáme v jihovýchodní Asii a Austrálii, kde je dominantním rodem *Sergentomyia* (Tesh 1988). Starosvětská flebotomí horečka je v Mediteránu působena viry Naples, Sicilian a Toscana, které přenášejí druhy *P. papatasi*, *P. perfiliewi* a *P. perniciosus* (Depaquit *et al.* 2010). Toscana virus byl navíc pomocí specifického markeru identifikován PCR amplifikací i v *Sergentomyia minuta*, u níž se myslelo, že saje pouze na gekonech a ještěrkách (Charrel *et al.* 2006). Dále byl u rodu *Sergentomyia* nalezen Chandipura virus čeledi Rhabdoviridae, izolovaný nejprve z pacienta v Indii a posléze z *S. babu*, *S. bailyi* a *S. punjabensis* (Geevarghese *et al.* 2005). Dalším je Perint virus z *S. berentiensis* odchycené na Madagaskaru, která je nejspíše jeho vektorem (Comer *et* Tesh 1991). K dalším virům, do

jejichž přenosu jsou flebotomové zapojeni, řadíme například 10 z 16 známých vesiculovirů (Comer *et Tesh* 1991). Některé z nich způsobují vezikulární stomatitidu u zvířat a encefalitidu u lidí (Lane 1993).

Mezi bakteriální onemocnění přenášené flebotomy patří bartonelóza v Novém světě působená *Bartonella bacilliformis*. Tato bakterie má dvě naprosto odlišné manifestace a je tak příčinou dvou patologicky odlišných onemocnění (Schultz 1968). Jejím potvrzeným přenašečem je *Lutzomyia verrucarum* (Cohnstaedt *et al.* 2012), ale uvažuje se i o zapojení dalších druhů rodu *Lutzomyia* (Lane 1993).

Z hlediska humánní i veterinární medicíny však mají nepochybně největší význam protozoární onemocnění, leishmaniózy. Jedná se o skupinu onemocnění působených různými druhy rodu *Leishmania*, které mají rozdílné klinické projevy. K přenosu parazita na hostitele dochází během sání vektora a následné regurgitace obsahu trávicí soustavy do tkání hostitele (Schlein, Jacobson *et Messer* 1992).

Ne všechny druhy flebotomů se ovšem podílejí na jejich přenosu. Často tyto druhy nesají na daných hostitelích, či se v nich parazit prostě nemůže vyvíjet. Aby mohlo dojít k rozvoji infekce v těle flebotoma a následnému přenosu na hostitele, nesmí být leishmánie defekovány spolu se zbytky nestrávené krve; tomu se brání unikem z peritrofické matrix (Killick-Kendrick 1985) a přichycením se pomocí bičíku na povrch střeva vektora. Dle způsobu tohoto přichycení můžeme flebotomy rozdělit na dvě skupiny: specifické a permisivní přenašeče (Volf *et Myskova* 2007). Klasickým příkladem specifického vektora je *P. papatasi*, který umožňuje vývoj jen *L. major*, která se přes lipofosfoglykan váže na galektinový receptor střeva přenašeče (Kamhawi *et al.* 2004) či *P. sergenti*, specificky přenášející pouze druh *L. tropica* (Kamhawi *et al.* 2000). Naproti tomu permisivní vektoři umožňují vývoj celé řadě leishmanií, které se váží přes lektinové komponenty svého povrchu na glykoproteiny nesoucí N-acetyl-galaktosamin ve střevě přenašeče (Myskova *et al.* 2007).

Do přenosu druhů rodu *Leishmania* jsou zapojeny především rody *Lutzomyia* a *Phlebotomus*, u rodu *Sergentomyia* se ale o možném zapojení do jejich přenosu stále uvažuje. Druhy tohoto rodu jsou prokázanými vektory příbuzných kinetoplastid z rodu *Sauroleishmania*, které parazitují v plazech Starého světa (Lane 1993). I přes řadu nálezů promastigotů rodu *Leishmania* v zástupcích rodu *Sergentomyia*, např. Senghor *et al.* 2011, Berdjane-Brouk *et al.* 2012 a Nzelu *et al.* 2014, dodnes nebylo potvrzeno, jestli je tento rod nějakým způsobem zapojen do jejich přenosu, ať mezi zvířaty, či mezi lidmi (Killick-Kendrick 1990). Experimentálními infekcemi laboratorní kolonie *S. schwetzi* třemi druhy

leishmanií (*Leishmania donovani*, *L. infantum* a *L. major*) bylo prokázáno, že tento hojný africký druh není schopen přenosu těchto lidských patogenů (Sadlova *et al.* 2013).

2.3 Morfologie a životní cyklus flebotomů

Dospělci jsou malé velikosti a celé tělo mají pokryto jemnými chloupky, barva se mění od světle hnědé až po šedivou či černou. Na hlavě najdeme velké a vždy oddělené složené oči, ale žádné ocelli (Williams 1993). Samice i samci mají podobné dlouhé antény nesoucí sěty na všech 16 člancích a dále také senzorické papily a receptory (Theodor 1948). Hrud' se skládá ze tří článků a na každém je jeden pár nohou. Druhý článek navíc nese pár křídel a třetí haltery, tedy přeměněný druhý pár křídel. Charakteristické klidové postavení lacertovitých křídel do tvaru písmene V umožňuje snadné rozpoznání živých jedinců. Abdomen má osm článků a v případě samců končí vnějšími genitáliemi (El-Hossary 2006), které po vylíhnutí rotují o 180° (Fairchild 1955). Samičí genitálie jsou téměř zcela internalizovány.

Aktivita flebotomů je většinou soumravná až noční (Killick-Kendrick 1999). Během dne bychom dospělé samice našli především v okolí míst, kde se zdržují jejich hostitelé (Rutledge *et Gupta* 2009), často jsou tak v okolí vesnic, ačkoliv flebotomové nejsou primárně antropofilní a pravděpodobně se u nich jedná pouze o adaptaci v urbánních a periurbánních oblastech (Killick-Kendrick 1999). Dospělé samice stejně jako samci sají rostlinné šťávy, zdrojem cukru navíc může být i medovice mšic a červců (MacVicker *et al.* 1990). Samice většiny druhů sají ještě krev obratlovců, neboť tu potřebují pro vývoj vajíček (Killick-Kendrick 1999) a mají proto mnohem složitější ústní ústrojí oproti značně redukovanému u samců. Samice mají v ústním ústrojí mandibuly, které slouží k rozříznutí kůže hostitele, a maxily, kterými se uchycují v ráně. Krev je pak sána z místa vpichu, kde byly poškozeny vlasečnice (Rutledge *et Gupta* 2009). Při trávení nasáté krve dochází k rozpadu krevních elementů, na čemž se zřejmě podílejí zuby v cibáriu a farynxu (El-Hossary 2006), k tvorbě peritrofické matrix a k absorpci krve, což přímo souvisí s dozráváním vajíček v ovariích (Rutledge *et Gupta* 2009). Několik druhů má ale schopnost autogenie, přičemž se pravděpodobně jedná pouze o nouzové řešení v případě nedostatku hostitelů, a snůška autogenních samic je vždy méně početná (El-Kammah 1973).

Rychlost vývoje flebotomů je výrazně ovlivněna teplotou a podnebím (Lewis 1982) a důležitou podmínkou je, že alespoň 50 dní v roce neklesne denní teplota pod 20 °C, aby mohl být dokončen životní cyklus (Perfilijev 1968). Vylíhlé larvy se vyvíjejí v humidních terestrických biotopech a živí se tlejícím organickým materiálem, houbami a mikroorganismy

(Hanson 1961). Celkem mají flebotomové čtyři larvální stádia a kuklu. Množství potravy výrazně ovlivňuje například následnou velikost dospělého (Theodor 1948). Podmínky během larválního vývoje mohou ale výrazně ovlivnit i vlastnosti celých populací. K různým chemickým a fyzikálním vlastnostem půd je přizpůsobivý především rod *Sergentomyia* a počet jeho jedinců stoupá hlavně v období dešťů (Basimike *et al.* 1992). Několik studií pak uvádí vazbu *P. orientalis* na černé vertisoly a vegetaci *Acacia seyal* a *Balanites aegyptiac* (např. Lewis 1987, Elnaiem *et al.* 1998), případně *P. martini* a *P. celiae* k termitišťům (Minter 1963) stejně jako rodu *Sergentomyia* (Basimike *et al.* 1992), nicméně později byly tyto vazby popřeny (Gebre-Michael *et al.* 2004). Tento rozpor byl pravděpodobně důsledkem vlivu mnoha faktorů na habitaty flebotomů. Mezi tyto faktory patří hustota vegetace, ovlivňující i teplotu a vlhkost, přítomnost termitišť a případných hostitelů a zdroje cukerných šťáv (Elnaiem 2011). Právě tyto faktory byly zdůrazněny v poslední studii z roku 2014, kde je vazba *P. orientalis* na hluboké trhliny ve vertisolech opět uvedena, a to jak v blízkosti zbytků porostů *Acacia seyal*, tak v polích, ačkoliv mnohem častěji tam byli zaznamenáni zástupci rodu *Sergentomyia*. Dospělci druhu *P. orientalis* byli též chyceni při vyletování z trhlín v půdě říčních toků. Tyto hluboké trhliny se zdají být optimálním místem vývoje larev flebotomů, jelikož teplota je zde konstantní a vlhkost zůstává i v době sucha. Stejně tak je zde dostatek organického materiálu, ať již ze stromů, tak z rostlin pěstovaných na polích a exkrementů zvířat (Moncaz *et al.* 2014 in press). Takto vyhraněný a dobře charakterizovaný biotop je ale spíše výjimkou a obecně platí, že konkrétní místa vývoje larev jsou známá jen u několika málo druhů. Mezi tyto patří třeba *P. papatasi*, jehož nedospělá stádia jsou v Indii opakovaně nalézána v přístřešcích pro zvířata a v lidských obydlích, stejně jako u druhu *P. argentipes* (shrnutí v Feliciangeli 2004).

2.4 Taxonomie podčeledi Phlebotominae

Během posledních asi 100 let bylo vytvořeno mnoho různých taxonomických systémů, které se lišili především subjektivním pojetím každého autora a charakteristikami, které si vybral ke klasifikaci. Podle těchto pak byly tvořeny taxonomické úrovně a zástupci rozdělováni do jednotlivých druhů. Velkým problémem se tak stalo, že skupiny druhů byly často charakterizovány dříve, nežli mohlo být popsáno více jejich zástupců, což posléze vedlo k tvorbě mnoha meziúrovní. Právě toto vytváření dalších taxonomických úrovní, nárůst počtu skupin a nových jmen značně sťažuje možnost porovnat (nejen) starší literaturu s tou novější,

mnoho článků je tak v novějších analýzách opomíjeno a chybí také celistvější a aktualizovaný přehled celé skupiny.

Pravděpodobně první popis [samce] flebotoma publikoval roku 1691 Bonanni v Římě (Lavoipierre 1947 cit. dle Theodor 1948), další zmínka je až z roku 1786, kdy Scopoli popsal samici *Bibio* [= *Phlebotomus*] *papatasi*. Teprve v roce 1840 se pak poprvé objevilo označení [rod] *Flebotomus*, které vymyslel Rondani a jeho zástupce zařadil do tribu Flebotomidae a čeledi Flebotominae (cit. dle Lewis *et al.* 1977). Dnes používáme označení *Phlebotomus*, jelikož název *Flebotomus* je latinizací a nesprávným přepisem z řečtiny. Flebotomie je medicínské pojmenování naříznutí žíly podle řeckého slova fléva, žíla (Williams 1993).

Čeď Phlebotomidae byla mezi Diptery uvedena roku 1851 Walkerem, Loew pak v roce 1862 čeď přejmenoval na Psychodidae se skupinami Psychodina a Phlebotomina. V roce 1903 Kertész zařadil do podčeledi Phlebotominae rody *Phlebotomus* a *Sycorax* (cit. dle Lewis *et al.* 1977).

Na počátku 20. století začaly být popisovány různé nové druhy, mezi prvními v roce 1908 *P. mascitti* z Říma popsán Grassim (cit. dle Theodor 1948) a *P. argentipes* z Indie (Annandale *et* Brunetti 1908). Roku 1911 popsal Newstead na Maltě *P. perniciosus* a *P. nigerrimus* a jako první se pokusil o rozdělení zástupců rodu *Phlebotomus*, které dělil podle postavení chloupků na abdominálních tergitech na dvě skupiny (Newstead 1911). V roce 1919 rod *Phlebotomus* rozčlenil Franca podle morfologie samčích genitálií a vznikly tak dva nové podrody: *Phlebotomus* ve Středomoří a *Newsteadia* v Africe (Franca 1919). O rok později Franca a Parrot přejmenovali africký podrod *Newsteadia* na *Sergentomyia*, a zároveň vytvořili třetí podrod *Neophlebotomus*, který zahrnoval druhy se znaky charakteristickými pro oba původní podrody (Franca *et* Parrot 1920). Ve stejném roce také Franca popsal nový podrod *Lutzia* z Jižní Ameriky (Franca 1920), jehož jméno bylo za čtyři roky změněno na *Lutzomyia*, Franca 1924.

Další dělení rodu *Phlebotomus* proběhlo už v roce 1921, kdy bylo vytvořeno pět podrodů *Brumptomyia*, *Lutzia*, *Phlebotomus*, *Prophlebotomus* a *Sergentomyia* na základě morfologie křídel a samčích genitálií a zástupci podrodu *Neophlebotomus*, který v tomto systému již nenajdeme, byli přiřazeni k podrodu *Sergentomyia*. Posléze se pak označení *Neophlebotomus* a *Sergentomyia* stala synonymy (Franca *et* Parrot 1921).

Roku 1926 Adler a Theodor objevili nové morfologické znaky, cibariální a faryngeální struktury, o nichž se domnívali, že by mohly pomoci ujasnit taxonomii (Adler *et* Theodor 1926). O rok později použil tyto znaky Sinton k popisu dalších zástupců rodu *Phlebotomus* (Sinton 1927b) a zároveň si povšiml, že Newsteadovo dělení zástupců podle postavení

chloupků na abdominálních tergitech se shoduje s dělením samic dle tvaru jejich spermaték (Sinton 1928b).

V klasifikaci zástupců na základě morfologie cibária a spermaték pokračoval Nitzulescu, který dle toho vytvořil nový systém rodu *Phlebotomus*, dělící ho na pět podrodů (Nitzulescu 1931). O tři roky později vytvořil svůj systém Parrot, který rozdělil rod *Phlebotomus* jen na dva podrody, *Phlebotomus* a *Prophlebotomus* (= *Sergentomyia*), opět na základě morfologie cibária (cit. dle Kirk *et* Lewis 1946).

Další členění rodu *Phlebotomus* navrhli v roce 1946 Kirk a Lewis, tentokrát rod dělili na tři podrody. Ke dvěma stávajícím [*Phlebotomus* a *Prophlebotomus*] přidali podrod *Sintonius*, Nitzulescu 1931. Podrod *Phlebotomus* byl klasicky definován postavenými chloupky na abdominálních tergitech, cibáriem bez armatury a pigmentových skvrn a u samic segmentovanou spermatékou. Charakteristiky podrodu *Prophlebotomus* byly přesně opačné, tedy chloupky na abdominálních tergitech položené, v cibáriu přítomna pigmentová skvrna, vyvinutá armatura a spermatéka samic hladká. U podrodu *Sintonius* byly typické znaky viditelné jen u samic a druhy popsané pouze na základě samců bylo velice těžké odlišit od zástupců podrodu *Prophlebotomus*. Mezi typické znaky posledního podrodu patřily víceméně položené chloupky na abdominálních tergitech, pigmentová skvrna, specifická armatura v cibáriu a vroubkovaná spermatéka u samic (Kirk *et* Lewis 1946).

Komplexněji se celým systémem zabýval v roce 1948 Theodor. Starosvětské zástupce podčeledi Phlebotominae rozdělil do dvou rodů, *Phlebotomus* a *Sergentomyia*. U prvního z rodů bylo pozorováno, že jeho zástupci sáli na savcích včetně člověka, zatímco zástupci druhého sáli především na plazech. Theodor popsal pouze tři druhy rodu *Sergentomyia* sající na savcích: *S. africana*, *S. babu* a *S. schwetzi*, z čehož bylo později usouzeno, že do přenosu nemoci je zapojen právě jen rod *Phlebotomus*. Rod *Sergentomyia* dle Theodora vznikl tedy sloučením předešlých podrodů *Prophlebotomus* a *Sintonius* podle Kirka a Lewise z roku 1946. Novosvětské zástupce flebotomů se také dělily do dvou rodů podle přítomnosti armatury v cibáriu; byla-li přítomna, jednalo se o rod *Lutzomyia*, v opačném případě o rod *Brumptomyia*, avšak Theodor uvažoval, zda by nebylo možné tyto zástupce přiřadit k starosvětskému rodu *Phlebotomus* (Theodor 1948).

V roce 1951 navrhnul Parrot zjednodušený systém starosvětských zástupců, ale v podstatě se jednalo o rehabilitaci systému, který navrhl už v roce 1934, tedy rozdělení rodu *Phlebotomus* na dva podrody, *Phlebotomus* a *Prophlebotomus*. Podle Parrota byl název rodu *Sergentomyia*, França a Parrot 1920, nesprávným synonymem jména *Prophlebotomus*, França a Parrot 1921, které považoval za jediné vyhovující označení, ale i nadále byla tato jména

uváděna jako synonyma, aby nedošlo k zbytečnému zmatení (cit. dle Abonnenc *et* Minter 1965). Název *Prophlebotomus* měl označovat druhy sající na plazech (Lewis 1987).

Klasifikaci novosvětských druhů se zabýval Barreto, který pro ně v roce 1961 navrhl tři rody: *Brumptomyia*, *Lutzomyia* a *Warileya* a o další rok později pak popsal sedm podrodů rodu *Lutzomyia* (cit. dle Theodor 1965).

K úplné změně taxonomie flebotomů došlo roku 1955, kdy Fairchild rozdělil čeleď Psychodidae podle žilkování křídel. Novou podčeleď Phlebotominae pak dělil na úrovni tribů na Phlebotomini (s rody *Hertigia*, *Phlebotomus* a *Warileya*) a Bruchomyiini (*Bruchomyia*, *Eutonnoiria* a *Nemopalpus*). Rod *Phlebotomus* rozdělil do pěti podrodů *Brumptomyia*, *Phlebotomus*, *Psychodopygus*, *Sergentomyia* a *Viannamyia* a tyto dále dělil na úrovni skupin, které odpovídaly dřívějším podrodům dle Theodora 1948. V rámci podrodu *Phlebotomus* rozeznával tři skupiny: *Papatasi*, *Brevifilis* a *Gigas* a stejně tak v podrodu *Sergentomyia*: *Minutus*, *Hospitii* a *Mirabilis*. Jednotlivé skupiny se dělily podle klasických znaků, jako bylo postavení chloupků na abdominálních tergitech a morfologie samčích a samičích genitálií (Fairchild 1955).

V roce 1972 publikoval svou práci Abonnenc, který vycházel z Fairchildova systému, zachoval však pouze rody *Hertigia*, *Phlebotomus* a *Warileya*, a navíc přidal rody *Idiophlebotomus* a *Spelaeophlebotomus*, které původně byly podrody, avšak na základě křídelní žilnatiny je povýšil (Abonnenc 1972).

Roku 1973 Duckhouse rozdělil čeleď Psychodidae na šest podčeledí: Bruchomyiinae, Horaellinae, Phlebotominae, Psychodinae, Sycoracinae a Trichomyiinae, a s touto klasifikací se setkáváme dodnes. Duckhouse také poukázal na to, že povýšíme-li Phlebotominae na čeleď, pak s nimi musíme sjednotit Bruchomyiinae a status čeledi udělit i malým skupinám jako Horaellinae a Sycoracinae (Duckhouse 1973). Proto pak byly v roce 1975 Phlebotominae definitivně prohlášeny za podčeleď, jak se na tom dohodli Lewis s Theorodem a Youngem. Důvodem byly společné morfologické znaky s dalšími zástupci z čeledi Psychodidae, které však zároveň nesnesly morfologické srovnání s ostatními čeleděmi příbuznými Psychodidae (Lewis *et al.* 1977).

Toto tvrzení odmítli Abonnenc a Léger a uvedli, že jméno Psychodidae (1854) je mladší než Phlebotominae (1851) a z toho důvodu by měla být čeleď Psychodidae přejmenována na Phlebotomidae a zároveň by tato měla být samostatnou čeledí, která by se dělila do tří úplně nových podčeledí: Euphlebotominae, Neophlebotominae a Disphlebotominae. Zástupci byli děleni hlavně podle žilkování křídel a pleurálních sít

(Abonnenc *et* Leger 1976). Tato nová označení se ale neujala a autoři se nakonec vrátili ke klasičtějším pojmenováním Phlebotominae, Lutzomyiinae a Hertigiinae.

Proti tomuto inovativnímu systému se ohradil v roce 1977 ve své práci Lewis. Podle něj byly ke klasifikaci použity nespolehlivé znaky, ale za důležité hlavně považoval, aby v jednotlivých taxonomických úrovních byl udržen co nejmenší počet skupin a také, aby byl zachován biogeografický koncept, tj. páry rodů v Novém a Starém světě. Lewis se ve své práci snažil především celou skupinu Phlebotominae prakticky uspořádat a sjednotit i její nomenklaturu, jelikož v té době existovala řada synonymních názvů jak pro druhy, tak rody i vyšší taxony. Lewisův systém v mnohém navazoval na ty, které navrhli Fairchild a Theodor. Podčeleď Phlebotominae byla rozdělena na pět rodů; rody *Phlebotomus* a *Sergentomyia* ve Starém světě a *Brumptomyia*, *Lutzomyia* a *Warileya* v Novém (Lewis *et al.* 1977). S tímto pojetím zásadně nesouhlasil Ashford, a to především s biogeografickým konceptem a vymežováním rodů na jeho základě. Upozornil, že při takovémto dělení bývá opomenuto mnoho znaků společných pro skupiny jak ze Starého tak Nového světa. Příkladem uvedl podobnosti mezi podrody *Grassomyia* a *Parvidens* (oba *Sergentomyia*) a novosvětskými druhy (Ashford 1991).

Další úplně nový systém vytvořili Artemiev a Neronov v roce 1984, kdy do podčeledi Phlebotominae zahrnuli čtrnáct rodů (cit. dle Rispaill *et* Leger 1998).

O tři roky později byl dle morfologických znaků popsán úplně nový rod, *Chinius*. Jeho první zástupce, druh *Chinius junlianensis*, byl odchycen roku 1982 ve vápencových jeskyních provincie Kuej-čou v S'-čchuanu (Leng 1987).

Pravděpodobně nejvyšší počet rodů, dvacet čtyři, vytvořil v roce 1991 Artemiev, který v této práci také odsoudil většinu předtím navržených systémů s tím, že se jednalo pouze o soupisy skupin a jejich zástupců, nikoli však o klasifikaci podčeledi Phlebotominae. V rámci svého systému rozdělil Phlebotominae na dva triby, sedm podtribů, dvacet čtyři rodů, čtyřicet podrodů a sedmdesát druhových skupin (Artemiev 1991).

V roce 1993 publikoval svůj systém Williams. Ačkoliv nahlížel na Lewisovu práci z roku 1977 jako na nejnovější taxonomické zpracování celé podčeledi, též se domníval, že se jedná spíše o soupis taxonomických skupin. Williams opět změnil status podčeledi Phlebotominae na čeleď, tu pak rozdělil na dvě podčeledi Bruchomyiinae a Phlebotominae. V rámci Bruchomyiinae popsal tři rody *Bruchomyia*, *Eutonnoiria* a *Nemopalpus* a v podčeledi Phlebotominae šest rodů: *Chinius*, *Phlebotomus* a *Sergentomyia* ve Starém světě, a *Brumptomyia*, *Lutzomyia* a *Warileya* v Novém (Williams 1993). Víceméně tedy navázal na Fairchildův systém z roku 1955.

Nový přístup, numerickou taxonomii, uplatnili v roce 1998 ve fylogenetické studii zástupců Starého světa Rispaill a Léger a na základě svých výsledků pak navrhli ve Starém světě sedm rodů flebotomů: *Australophlebotomus*, *Chinius*, *Idiophlebotomus*, *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Spelaeomyia* a *Spelaeophlebotomus* (Rispaill *et* Leger 1998).

Také v roce 1998 publikoval svou práci Depaquit, jednalo se o molekulární studii příbuznosti rodů *Lutzomyia*, *Phlebotomus* a *Sergentomyia* na základě analýzy sekvence D2 domény 28S rDNA. Dle výsledků uvedl Depaquit rod *Sergentomyia* jako příbuznější rodu *Lutzomyia* než rodu *Phlebotomus*. Zatímco rod *Lutzomyia* se ukázal být monofyletický, rod *Phlebotomus* byl spíše parafyletický a brzy se z něj odštěpily podrody *Phlebotomus*, *Paraphlebotomus* a později *Larroussius*. K těmto událostem došlo pravděpodobně dříve než k rozdělení Nového a Starého světa (Depaquit *et al.* 1998).

Další nesouhlas s Lewisovým biogeografickým konceptem a podporu bližší příbuznosti novosvětských a starosvětských druhů vyjádřili v roce 1999 Freitas s Barrettem. Lewis ve své práci pochybuje o této bližší příbuznosti, ale právě na její podporu uvedli tyto dva druhy *Lutzomyia derelicta*, který označili za plesiomorfni variantu rodů *Lutzomyia* a *Sergentomyia*. Tuto domněnku založili na morfologických znacích, které ač jsou typické pro jeden či druhý rod se u tohoto druhu vyskytují společně. Konkrétně má tento druh nejbližší podrodu *Sintonius* rodu *Sergentomyia* (Freitas *et* Barrett 1999).

V roce 2000 byla provedena další molekulární studie, tentokrát se jednalo o analýzu malé podjednotky jaderné rDNA. Aransay zde potvrdila podčeleď Phlebotominae jako monofyletickou a stejně tak rod *Phlebotomus*, k němuž a k rodu *Sergentomyia* navíc přiřadila ještě rod *Chinius* ve Starém světě a v Novém světě uvedla tři rody: *Brumptomyia*, *Lutzomyia* a *Warileya* (Aransay *et al.* 2000).

Roku 2004 provedl Ilango taxonomickou studii podrodů flebotomů Starého světa založenou především na znacích spermaték samic. Starosvětští flebotomové se ukázali jako monofyletická skupina, přičemž podrody *Idiophlebotomus* a *Spelaeophlebotomus* byly označeny za sesterské bazální linie. Z tohoto důvodu by měly být blíže podčeledi Sycoracinae a Ilango navrhl, aby s ní byly tyto skupiny sdruženy, například na úrovni tribu, a dostaly obě status rodu. Rod *Phlebotomus* vyšel jako monofyletický oproti rodu *Sergentomyia*, který jako polyfyletický zahrnul rod *Chinius* a podrod rodu *Phlebotomus*, *Australophlebotomus* (Ilango 2004).

Dnes se v literatuře nejčastěji setkáme se systémem, který v roce 1977 navrhl Lewis, přestože se postavení několika skupin změnilo či ještě mění, jelikož systematika flebotomů není ani dnes jednoznačně vyřešena. Problematika se nejvíce týká úrovní podčeledí, rodů a

podrodů. K ujasnění taxonomie však máme v dnešní době asi nejbližší díky možnosti aplikace mnoha molekulárních metod, jelikož samotné morfologické znaky nejsou vždy ty nejspolehlivější, jednak vzhledem ke své možné variabilitě, ale také kvůli možnosti existence kryptických druhů.

2.5 Rody *Phlebotomus* a *Sergentomyia*

Odlišení rodů, ale především podrodů, je u flebotomů poměrně komplikované. Až do popsání vnitřních morfologických znaků Adlerem, Theodorem a Sintonem v roce 1926 bylo toto dělení celkem jednoduché na základě vnější morfologie, ale nové znaky vedly k popisu mnoha nových podrodů a tak komplikaci celého systému.

2.5.1 Rod *Sergentomyia* (Franca et Parrot 1920)

Druhy rodu *Sergentomyia* byly původně popsány jako podrod *Newsteadia*, Franca 1919, rodu *Phlebotomus*. O rok později se název tohoto podrodu změnil na *Sergentomyia*, Franca et Parrot 1920, a posléze se část zástupců přesunula ještě do podrodu *Prophlebotomus*, Franca et Parrot 1921. Samostatným rodem se zástupci stali až v roce 1948 (Theodor 1948).

Morfologická definice rodu *Sergentomyia* není jednoduchá, jelikož její podrody zahrnují množství výjimek, ale mezi nejzákladnější charakteristiky patří položené chloupky na abdominálních tergitech, čtyři trny na stylu samců a výrazná armatura v cibáriu a farynxu. Již podle velikosti a struktury armatury lze poznat pohlaví, jelikož u samic je armatura mnohem rozvinutější než u samců (Theodor 1948) u obou pohlaví pak může být vidět pigmentová skvrna rozličného tvaru a velikosti. Zástupci toho rodu mají také hladkou špičku hypofarynxu (El-Hossary 2006).

Pro rod *Sergentomyia* jsou sice typické položené chloupky s půlměsíčitou bází, ale podrod *Sintonius* je v tomto výjimkou a chloupky na abdominálních tergitech má vztyčené (Lane 1993). Mnohem spolehlivější je charakterizovat tento rod podle genitálií, jejichž morfologie je poměrně konzervovaná. U samců rodu *Sergentomyia*, s výjimkou dvou druhů *S. (Spelaeomyia) darlingi* a *S. (Spelaeomyia) mirabilis*, nenajdeme výběžek se sétami na koxitu a na stylu jsou jen čtyři trny (Theodor 1948). Kromě uvedených dvou druhů tvoří výjimku navíc *S. lesleyae*, *S. heischii* a *S. iranica* z podrodu *Parvidens*, které mají na stylu trnů pět (Theodor et Mesghali 1964). U samic jsou důležité spermatéky, které jsou typicky hladké, ale třeba u *S. (Grassomyia) squamipleuris* nebo podrodu *Sintonius* bývají nedokonale segmentované či pokryté trny (Theodor 1948). Podle Ashforda by mohly od ostatních rodů

rod *Sergentomyia* odlišit též mikrotrichy na šestém abdominálním tergitu, které jsou u všech zástupců, s výjimkou *S. (Parvidens) heischii*, dvou různých velikostí. U *Sergentomyia (Parvidens) lesleyae* jsou tyto mikrotrichy dokonce i na pátém tergitu (Ashford 1991).

Dnes do rodu *Sergentomyia* řadíme jedenáct podrodů: *Capensomyia*, *Demeillonius*, *Grassomyia*, *Neophlebotomus*, *Parrotomyia*, *Parvidens*, *Rondanomyia*, *Sergentomyia*, *Sintonius*, *Spelaeomyia* (Seccombe, Ready *et* Huddleston 1993) a *Vattieromyia* (Depaquit, Leger *et* Robert 2008), přičemž v některých ještě rozeznáváme druhové skupiny. Jediné, co tyto podrody mez sebou odlišuje, je tvar aedeagu či spermatéky a struktura cibária a farynxu (Theodor 1965).

2.5.1.1 Vybrané druhy rodu *Sergentomyia*

V této kapitole jsou představeny nejčastější druhy v našich sběrech.

❖ podrod *Sintonius*

V roce 1931 jej v rámci rodu *Phlebotomus* popsal Nitzulescu a zařadil do něj šest druhů s vyvinutou armaturou v cibáriu (Nitzulescu 1931); dalšími charakteristikami jsou pigmentová skvrna v cibáriu, malé segmentované spermatéky a krátký špičatý aedeagus, v případě druhů skupiny clydei ještě vztyčené chloupky na abdominálních tergitech. Tento podrod tvoří morfologicky přechod mezi rody *Phlebotomus* a *Sergentomyia* (Theodor 1948). Mnoho jeho druhů sice sají na lidech (Quate 1964), ale většina upřednostňuje plazy, mezi nimiž přenášejí sauroleishmanie (Lane 1993). Většinu zástupců najdeme v suchých oblastech Starého světa a můžeme je rozdělit do dvou druhových skupin: clydei, s maximálně 18 zuby v cibáriu, a hospitii (Lewis 1978). Nitzulescu typovým druhem zvolil *P. hospitii*, Sinton 1924.

➤ *Sergentomyia adleri*

Poprvé ji popsal v roce 1933 Theodor z Ghany v rámci skupiny minutus rodu *Phlebotomus* a pojmenoval ji po profesoru Adlerovi. Samice jsou charakterizovány řadou 20 špičatých zubů a čtyřmi až pěti řadami drobných zubů před ní, velkou pigmentovou skvrnou srdcovitého tvaru a spermatékou s 10 až 12 segmenty, přičemž spermadukty jsou velice dlouhé a úzké. Samci mají v cibáriu řadu s 10 až 12 špičatými zuby a před ní mohou být dvě až tři řady drobných zubů a pigmentová skvrna je trojúhelníkovitá. Dva trny na stylu jsou terminální a druhé dva lehce subterminální, aedeagus je krátký a špičatý (Theodor 1933).

V Keni a Súdánu bylo prokázáno, že její zástupci sají na lidech a navíc v nich byla nalezena neidentifikovaná promastigotní infekce (Mutinga *et al.* 1986), v Senegalu v nich identifikovali *Trypanosoma* sp. (Desjeux *et* Waroquy 1981).

➤ *Sergentomyia clydei*

Popsána byla v roce 1928 Sintonem, který jí pojmenoval po kapitánu Clydovi. První zástupci byli chyceni v pákistánské provincii Vazíristán a zařazení do skupiny minutus rodu *Phlebotomus*. Samice mají chloupky na abdominálních tergitech převážně položené, ale některé jsou vztyčené. V cibáriu je výrazná trojúhelníkovitá pigmentová skvrna a 15 velkých špičatých zubů, dlouhé jehlovité zuby najdeme i v zadní části farynxu. Spermatéky jsou segmentované (Sinton 1928a), ačkoliv pro skupinu minutus jsou typické hladké (Sinton 1927a). U samců je též pigmentová skvrna, ovšem ne tak výrazná a v cibáriu jedna až dvě řady malých zubů. Genitálie jsou typu minutus a aedeagus je špičatý (Sinton 1928a).

V roce 1939 byl z Etiopie popsán *Phlebotomus vagus* na základě rozdílné morfologie spermatéky, cibariální struktury a křídel (Parrot *et* Martin 1939). O pět let později byl tento synonymizován s *P. clydei* a rozdílnosti byly shledány jako morfologické variace (Parrot *et* Martin 1944).

Taktéž v roce 1939 byl popsán *P. viator* z Etiopie jako podobný *P. hodgsoni* (Parrot *et* Martin 1939), i tento byl roku 1947 synonymizován s *P. clydei* (Parrot *et* Durand-Delacre 1947).

Nakonec roku 1958 Theodor popsal *S. latiterga* jako poddruh *S. clydei*. Tento se vyznačoval velikým šestým tergitem, ale později bylo zjištěno, že samci se zvětšeným i normální šestým tergitem se vyskytují na stejném území. Na základě dalších odchytů bylo tedy usouzeno, že velikost šestého tergitu variuje v rámci druhu a není tudíž diferenčním znakem a poddruh *S. latiterga* byl o osm let později synonymizován s *S. clydei* (Theodor *et* Mesghali 1964). Různý je i počet zubů (10 až 15) v cibáriu samic (Lewis 1978) a právě vysokou vnitrodruhovou variabilitou *S. clydei* se zabývá nedávná molekulární a morfologická studie (Depaquit *et al.* 2014).

Zástupci *S. clydei* sají na savcích včetně člověka a byli v nich opakovaně nalezeni promastigoti. Předpokládá se, že druh je hlavním přenašečem *Sauroleishmania adleri* (Kaddu 1986) a v Súdánu by mohl přenášet *Sauroleishmania hoogstraali*. V Senegalu v ní též našli neurčené zástupce rodu *Trypanosoma* (Desjeux *et* Waroquy 1981).

❖ podrod *Parrotomyia*

Theodor popsal tento podrod v rámci rodu *Sergentomyia* v roce 1958 a jako typový druh zvolil *Phlebotomus africanus*, Newstead 1912 (Theodor 1958). Ještě dříve však popsáné druhy tohoto podrodu sloučil ve skupině africana v roce 1948 (Theodor 1948). Pro tento podrod je typická výrazná armatura v cibáriu a druhy se dělí do několika druhových skupin:

africana, *babu*, *denticulata* a *grekovi*. Zástupce najdeme na celém území Starého světa a v Austrálii, což vede opět k vysoké morfologické variabilitě. Skupina *africana* má podlouhlé spermatéky a od ostatních se liší i vysokým počtem silných zubů v cibáriu (Lewis 1978).

➤ ***Sergentomyia africana africana***

Tento zástupce byl popsán poprvé Newsteadem z Nigerie jako *Phlebotomus minutus* var. *africanus* v rámci rodu *Phlebotomus*. Od *P. minutus* se lišil délkou druhého a čtvrtého palpálního segmentu a špičatějšími křídly (Newstead 1912). V roce 1926 Adler a Theodor vyzdvihli důležitost vnitřních morfologických znaků, což posléze vedlo k ustanovení *P. minutus* var. *africanus* samostatným druhem *P. africanus* (Kirk et Lewis 1946).

V roce 1936 popsal Parrot *P. africanus* var. *longior* v rámci podrodu *Prophlebotomus*, rodu *Phlebotomus*. Od ostatních variet se tato odlišovala počtem cibariálních zubů a velikostí armatury farynxu (Parrot 1936), ale se *S. a. africana* byla později synonymizována (Abonnenc 1972).

O rok později než varieta *longior* byl popsán *P. africanus* var. *niger* a ten se též odlišoval počtem cibariálních zubů (Parrot et Schwetz 1937). Tato varieta byla synonymizována v roce 1960 Lewisem a Kirkem a určena jako lektotyp druhu *S. a. africana*. Autoři navíc považovali její cibariální armaturu za tak různorodou, že i druh *P. freetownensis*, Sinton 1930, by mohl být podle nich považován pouze za varietu *S. a. africana* (Lewis et Kirk 1960).

V Keni byla v jejích zástupcích nalezena neidentifikovaná promastigotní infekce (Kaddu 1986).

➤ ***Sergentomyia eremitis***

V roce 1945 popsali Parrot a de Jolinière z Alžíru nový druh rodu *Phlebotomus*, velmi podobný zástupcům skupiny *africanus*. Samice i samec se morfologií pohlavních orgánů velice podobali *P. africanus*, ale dle armatury cibária a farynxu a především velikosti palpáních článků byl tento zástupce uznán jako samostatný druh a nikoliv pouze jako morfologická varieta (Parrot et de Jolinière 1945). Jako různé variety zástupců komplexu *africana* se však tento druh objevoval v pozdější literatuře, ačkoliv k žádné synonymizaci s jiným druhem nikdy nedošlo, tato možnost byla pouze jednou naznačena (Rioux et al. 1975).

➤ *Sergentomyia magna*

Tento druh byl popsán Sintonem z jižní Afriky v roce 1932 jako *Phlebotomus africanus* var. *magnus* rodu *Phlebotomus*, ale podle přeměření různých částí těla se zdál bližší druhu *P. freetownensis* (Sinton 1932b).

O rok později byl popsán druh *P. africanus* var. *sudanicus*, který měl méně cibariálních zubů než typický *P. africanus* a armaturu farynxu též menší. Sinton navíc upozornil, že *P. africanus* var. *magnus* by mohl být jen větší varietou *P. africanus*, stejně tak *P. freetownensis*, jelikož počet cibariálních zubů je značně variabilní (Sinton 1933). Varieta *sudanicus* byla s *S. a. magna* synonymizována v roce 1960, jelikož znaky, které je odlišovaly, nebyly příliš jasné a navíc se obě variety vyskytovaly na stejném území. Lewis s Kirkem také navrhli, aby *S. a. magna* byla pouze poddruhem *S. a. africana*, vzhledem k tomu, že se vykytují ve stejných oblastech a byly nalezeny jejich intermediární formy (Lewis et Kirk 1960).

Druh *P. africanus* var. *ater* podrodu *Prophlebotomus* byl popsán v roce 1936 z Etiopie na základě odlišné barvy a tvaru pigmentové skvrny v cibáriu, kratšího čtvrtého palpálního článku a armatury farynxu (Parrot 1936). V roce 1944 byl popsán *P. africanus* var. *meridianus* z jižní Afriky odlišující se počtem cibariálních zubů (Meillon et Lavoipierre 1944). Vzhledem k velice podobné morfologii obou variet proběhla v roce 1969 synonymizace a její autoři také definitivně oddělili zástupce *S. a. africana* a *S. magna* na základě morfologie larválních stádií. Zatímco u larev L4 *S. a. africana* je druhý pár sít na VIII. abdominálním tergitu velmi redukovaný, tak u larev L4 *S. magna* jsou tyto sěty dlouhé a silné (Abonnenc et Yvove 1969).

V Senegalu byli v zástupcích *S. magna* identifikováni blíže neurčení zástupci rodu *Trypanosma* (Desjeux et Waroquy 1981).

❖ podrod *Parvidens*

Jako podrod rodu *Sergentomyia* jej v roce 1964 popsali Theodor a Mesghali s typovým rodem *Phlebotomus lesleyae*, ačkoliv se předtím vzhledem k podobnostem s podrodem *Euphlebotomus* uvažovalo o jeho zařazení do rodu *Phlebotomus*. Druhy tohoto podrodu vykazují znaky charakteristické jak pro rod *Phlebotomus* tak *Sergentomyia*, vzhledem k této jejich odlišnosti, by skupina mohla mít i status rodu (Theodor et Mesghali 1964). Lewis však považoval její zástupce za bližší rodu *Sergentomyia* (Lewis et Mesghali 1961).

Ačkoliv mají samice nesegmentované spermatéky a armaturu cibária odlišnou od typické rodu *Sergentomyia*, jsou mu pravděpodobně blíže, jednak díky tvaru křídel a jejich

žilkování, ale také tvaru spermaték a přítomnosti armatury v cibáriu. Samci mají sice na stylu pět silných trnů, což je typické pro rod *Phlebotomus*, ale zřejmě se také jedná o původní stav (Theodor *et* Mesghali 1964). To bylo základem teorie, že tato skupina druhů by mohla být předky Phlebotominae, z nichž se posléze vyvinuly starosvětské rody (Davidson 1982).

Zástupci tvoří malou skupinu, do které dnes řadíme pouze čtyři druhy: *S. arida*, *S. heischii*, *S. iranica* a *S. lesleyae*.

➤ *Sergentomyia lesleyae*

Popsaná byla Lewisem a Kirkem v roce 1946 v rámci rodu *Phlebotomus* a pojmenovaná po manželce prvního z nich. V cibáriu samic najdeme jen malé hřebeny, ale nikoli pigmentovou skvrnu, spermatéky jsou tenkostěnné a hladké. Samci nemají v cibáriu žádné struktury a stylus nese pět trnů, dva terminální, dva subterminální a poslední je asi v jeho polovině. U obou pohlaví jsou chloupky na abdominálních tergitech vztyčené (Lewis *et* Kirk 1946).

❖ podrod *Sergentomyia*

Prvním jménem tohoto bývalého podrodu rodu *Phlebotomus* bylo v době jeho popsání *Newsteadia* (Franca 1919), o rok později se změnilo na *Sergentomyia* (Franca *et* Parrot 1920) a další rok na *Prophlebotomus* (Franca *et* Parrot 1921), aby se roku 1948 podrodu vrátilo opět jméno *Sergentomyia*, které se též stalo jménem nového rodu (Theodor 1948). Typovým druhem byla zvolena *Sergentomyia minuta* (Franca 1920).

Dnes můžeme druhy v tohoto podrodu rozdělit do tří druhových skupin: bedfordi, fallax a schwetzi (Seccombe, Ready *et* Huddleston 1993) a v rámci rodu *Sergentomyia* se jedná o jeden z největších podrodů, jehož druhy a jejich variety byly mnohokrát synonymizovány.

Samice mají dlouhou a širokou hladkostěnnou spermatéku se širokými spermadukty a samci tlustý tvarově variabilní aedeagus. V cibáriu je viditelná velmi tmavá pigmentová skvrna a neobvyklé zuby (Davidson 1987). Zástupce najdeme hlavně v západní Asii a Africe (Lewis 1978), kde sají jak na plazech, tak na savcích. V zástupcích byli nalezeni promastigoti jak savčích, tak plazích leishmanií (Githure *et al.* 1995 cit. dle Anjili *et al.* 2011).

➤ *Sergentomyia antennata*

V roce 1912 popsal Newstead samici z Ghany jako druh rodu *Phlebotomus*. Nový druh se hodně podobal druhu *P. minutus*, ale celkově byl menší a mohutnější, především antenální články byly neobvykle krátké a tlusté (Newstead 1912). Samec byl popsán až o osm let později, přičemž antenální články byly shledány jen o málo delší než u samic (Newstead 1920).

V tom samém roce byla popsána samice *P. signatipennis* z Ghany jako malý, velice chlupatý druh. Samice byla poměrně robustní, antenální segmenty byly opět kratší a chloupky na abdomenu měla velmi dlouhé, většina z nich byla položená, ale některé vztyčné (Newstead 1920). S tímto druhem byla v roce 1942 díky vysoké podobnosti synonymizována samice *P. sanneri* (Parrot 1942), kterou popsali roku 1931 Galliard a Nitzulescu z Gabonu (cit. dle Seccombe, Ready *et* Huddleston 1993). *Phlebotomus signatipennis* byl s *P. antennatus* nakonec synonymizován v roce 1951 na základě cibariální armatury (Parrot 1951).

Phlebotomus minutus var. *occidentalis* popsal v roce 1933 Theodor ze západní Afriky jako podobný ostatním varietám *P. minutus* (var. *antennatus*, var. *signatipennis*). V roce 1944 byl Parrotem a Martinem dále popsán *P. cinctus* v podrodu *Prophlebotomus*. K synonymizaci obou těchto variet došlo roku 1964 a v tomto článku je také ukázka toho, kolik jmen *S. antennata* v průběhu let získala. Je zde definována především krátkým třetím antenálním segmentem u obou pohlaví, tmavou pigmentovou skvrnou v cibáriu a otrněním farynxu u samic a tupým aedeagem u samců (Quate 1964). Nakonec ale v roce 1972 byla vzata zpět synonymizace *P. cinctus* a tento zástupce získal status samostatného druhu *S. cincta* (Abonnenc 1972).

Tento druh je velice častý v termištích a sají i na savcích. V zástupcích v Keni byli často nalezeni blíže neurčení promastigoti (Kaddu 1986).

➤ *Sergentomyia schwetzi*

Samce i samici popsali v roce 1929 Adler, Theodor a Parrot ze Zaire v rámci rodu *Phlebotomus* a pojmenovali je po doktoru Schwetzovi. Samice byla charakteristická svou cibariální a faryngeální armaturou a samec navíc ještě postavením trnů na stylu, kdy dva jsou terminální a dva subterminální (Adler, Theodor *et* Parrot 1929). O rok později poměrně detailně popsal Sinton *P. symesi* z Keni, ale žádnou případnou podobnost či odlišnost od *P. schwetzi* nezmínil (Sinton 1930). Tento druh tak byl o další rok později synonymizován s *P. schwetzi* na základě shodných morfologických popisů (Theodor 1931).

V roce 1936 popsal Parrot v podrodu *Prophlebotomus* nový druh z Etiopie, *P. schwetzi* var. *aethiopicus*. Samec i samice byli velice podobní *P. schwetzi* a odlišovali se jen větší velikostí samčích pohlavních orgánů a šířkou farynxu samic (Parrot 1936). Vzhledem k těmto nepatrným rozdílům byla tato varieta následně synonymizována (Parrot, Mornet *et* Cadenat 1945).

O deset let později byla z Mali popsána samice *P. guiraudi* podrodu *Prophlebotomus*, ale samec nikdy popsán nebyl (Kevran 1946). V roce 1969 došlo k její synonymizaci

s *S. schwetzi* (Lewis, Barnley *et* Minter 1969). Taktéž v roce 1946 byl Lewisem a Kirkem popsán druh *P. hogarni*, ale posléze bylo zjištěno, že samice tohoto druhu byla ve skutečnosti *S. schwetzi* a samec *S. squamipleuris* (Lewis *et* Kirk 1957).

Druhá varieta, *P. schwetzi* var. *nigricans*, byla popsána pouze na základě samice ze Súdánu, která se odlišovala délkou třetího antenálního segmentu, větší pigmentovou skvrnou v cibáriu a pálpální formulí (Parrot 1948). Jelikož se jednalo opět pouze o drobné rozdíly, byla tato varieta roku 1969 synonymizována (Lewis, Barnley *et* Minter 1969).

Posledním novým druhem byla *S. murphyi*, která byla popsána už v rámci podrodu *Sergentomyia*, jako druh velice podobný *S. schwetzi*, od níž se odlišovala zvětšeným šestým abdominálním tergitem a čtyřmi skoro terminálními trny na stylu u samců, přičemž samice byly téměř neodlišitelné (Lewis *et* McMillan 1961). I tento druh byl posléze synonymizován jako jedna z forem *S. schwetzi* (Lewis, Barnley *et* Minter 1969).

Abonnenc pak o tři roky později opět vyčlenil samici variety *nigricans* jako poddruh *S. schwetzi* (Abonnenc 1972).

Formy *S. schwetzi*

Původně popsany *P. schwetzi*, Adler, Theodor *et* Parrot 1929, je považován za typickou formu tohoto druhu, pro niž je charakteristické, že u samců je pátý a šestý abdominální tergitek víceméně stejné velikosti a trny na stylu jsou dva terminální a dva subterminální. Později však byly popsány ještě další formy.

První byla atypická forma *P. schwetzi*, kterou v roce 1959 definoval Abonnenc na základě Parrotova (1948) popisu samce *P. schwetzi*, jež měl trny na stylu velmi blízko sebe, a svého pozorování. Abonnenc zjistil, že spolu se zvětšeným šestým abdominálním tergitem se jedná o konstantní znak některých samců *P. schwetzi*. U samic žádné morfologické rozdíly nalezeny nebyly. Obě formy se také vyskytují ve stejných oblastech (Abonnenc 1959). Tento popis atypického samce *S. schwetzi* by pravděpodobně mohl být shodný s pozdějším popisem *S. murphyi*, Lewis *et* McMillan 1961 (Minter 1963).

Podobně na dvě formy rozdělili druh *S. schwetzi* Wijers a Minter v Keni. Dvě sezónní formy charakterizovali na základě genitálií samců, přičemž pátý a šestý abdominální segment byly stejné velikosti, a žádné rozdíly nebyly nalezeny ani u samic. Typická forma dle originálního popisu se vyskytovala pouze v období sucha a druhá atypická forma hlavně v období dešťů společně s *S. garnhami* (Wijers *et* Minter 1962). Avšak v letech, kdy tato období nebyla příliš jasně oddělena, po většinu roku převládala typická forma a atypická byla

velmi vzácná. Minter dále uvedl, že zástupci typické formy *S. schwetzi* v Keni byli větší a světlejší, než zástupci formy atypické a též častěji napadali člověka (Minter 1963).

Jiné dvě formy *S. schwetzi* pak popsali Lewis, Barnley a Minter. První byla forma Amudat, pojmenovaná podle oblasti ve východní Ugandě, pro niž jsou typické terminální trny na stylu a šestý abdominální tergít stejné velikosti jako pátý. K této formě pravděpodobně náležela i samice popsaná jako *P. schwetzi* var. *nigricans*. Tato forma je také morfologicky mnohem variabilnější než ostatní a zahrnuje velké množství podforem. Mimo jiné se také častěji vyskytuje během období dešťů a najdeme ji ve východní Africe. Druhou formou je Rangu, pojmenovaná podle oblasti v Súdánu a shodná s popisem atypické formy, Abonnenc 1959, a *S. murphyi*, Lewis et McMillan 1961. Vyznačuje se tedy zvětšeným šestým abdominálním tergitem a čtyřmi terminálními či téměř terminálními trny na stylu samců. Tato forma se vyskytuje především v západní Africe (Lewis, Barnley et Minter 1969). *Sergentomyia murphyi* byla též shledána jako častější v období dešťů a období sucha tedy zřejmě přečkávala v kukle (Lewis et Murphy 1965).

2.5.2 Rod *Phlebotomus* (Rondani et Berte 1840)

Rodové označení *Phlebotomus* (resp. *Flebotomus*) se poprvé objevilo v roce 1840 (Rondani cit. dle Lewis et al. 1977). Podrody tohoto rodu se během let často měnily, ale jeho základní charakteristiky zůstaly stejné; zástupce najdeme ve Starém světě a to především v jeho severnějších oblastech, sají na savcích a jsou zapojeni do přenosu infekčních onemocnění člověka.

Základní charakteristikou rodu *Phlebotomus*, ale i rodu *Lutzomyia*, jsou vztyčené chloupky s kruhovou bází na abdominálních tergitech (Lane 1993) a nikdy u tohoto rodu nenajdeme pleurální sěty (Anjili et al. 2011). Druhy z rodu *Phlebotomus* se také vyznačují variabilními vnějšími genitáliemi samců, stylus tak nese buď tři, nebo až pět trnů (Lewis 1982), typický je pro ně též výběžek nesoucí sěty na koxitu (Theodor 1948). U samců jsou také na rozdíl od rodu *Sergentomyia* všechny mikrotrichy na abdominálních tergitech stejné velikosti (Ashford 1991). Pro samice je typické, že spermatéky jsou celé nebo alespoň částečně segmentované (Theodor 1948).

Přestože je známo několik výjimek (shrnutí v Ashford 1991), mají zástupci rodu *Phlebotomus* obvykle v cibáriu pouze jednotlivé zuby či trny, které nikdy netvoří výraznou armaturu (Theodor 1948), také u nich nikdy není viditelná pigmentová skvrna (Anjili et al. 2011). Špička hypofarynxu je u jeho zástupců pilovitá (El-Hossary 2006). Dorzální vyboulení cibária byl sice původně znak popsán jako synapomorfie rodů *Brumptomyia* a *Lutzomyia*

(Theodor 1965), ale posléze byl popsán i u druhu *Phlebotomus (Australophlebotomus) brevifilis* z Austrálie (Lewis *et al.* 1977).

Rod *Phlebotomus* v dnešní době zahrnuje dvanáct podrodů: *Adlerius*, *Anaphlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Euphlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Kasaulius*, *Larroussius*, *Paraphlebotomus*, *Phlebotomus*, *Spelaeophlebotomus*, *Synphlebotomus*, *Transphlebotomus* (Seccombe, Ready *et* Huddleston 1993) a *Legeromyia* (Rahola *et al.* 2013).

2.5.2.1 Vybrané druhy rodu *Phlebotomus*

V abecedním pořadí jsou zde představeny druhy, s nimiž jsme pracovali, a které zároveň patří mezi nejdůležitější přenašeče lidských leishmanií.

❖ podrod *Adlerius*

Podrod definoval v roce 1931 Nitzulescu v rámci rodu *Phlebotomus* a pojmenoval ho po S. Adlerovi. Zástupce zařadil do podskupiny druhů bez cibariální armatury a hladkými spermatékami samic. Jako typový druh zvolil *P. chinensis*, Newstead 1916, a k němu do podrodu zařadil ještě *P. larroussiei* (Nitzulescu 1931), ale ten byl v roce 1948 synonymizován s *P. (Transphlebotomus) mascitti*.

Bližší morfologické charakteristiky byly popsány až později. Samci nemají na koxitu lobus, stylus nese pět silných trnů a spermatéka samic je nedokonale segmentovaná (Lewis 1978). Faryngeální armatura má trojúhelníkovitý až kruhový tvar a zuby jsou střední velikosti (Theodor 1948). Tento podrod je blízkce příbuzný a také morfologicky podobný podrodům *Larroussius* a *Transphlebotomus*, samci mají víceméně stejné genitálie, ale liší se armatura farynxu a spermatéky u samic (Theodor 1948). Zástupci se vyskytují v mírných a aridních oblastech Starého světa (Lewis 1978).

➤ *Phlebotomus arabicus*

Původně byl tento druh popsán jako *P. chinensis arabicus*, tedy jako poddruh *P. chinensis*, který měl díky širokému areálu rozšíření mnoho různých variet. Tyto jednotlivé variety se nejčastěji lišily tvarem aedeagu, délkou genitálních filament a armaturou farynxu u samců a různými morfologickými mírami u samic (Theodor 1953). Status druhu připsal tomuto poddruhu až Artemiev v roce 1980.

Ve stejném článku popsal Artemiev i nový druh *P. davidi* jako malého světlého zástupce. Na základě dalších měření byl však tento druh synonymizován s *P. arabicus* (Lewis *et* Buttiker 1982).

Phlebotomus arabicus je důležitým přenašečem kutánní leishmaniózy působené *L. tropica* v Izraeli (Svobodova *et al.* 2006b) a tato jeho role byla potvrzena i experimentálně (Svobodova, Volf *et Votypka* 2006a).

❖ podrod *Larroussius*

Jako podrod rodu *Phlebotomus* jej popsal v roce 1931 Nitzulescu. Skupina pěti druhů se řadila mezi zástupce bez cibariální armatury a se segmentovanými spermatékami samic. Typovým druhem je *P. major*, Annandale 1910 (Nitzulescu 1931). Samci tohoto podrodu mají krátký stylus s pěti trny, z nichž dva jsou terminální a tři asi v polovině stylu, aedeagus má variabilní tvar a je poměrně dlouhý. Ve farynxu najdeme mnoho malých špičatých zubů a spermatéky samic jsou segmentované, s dlouhým terminálním výběžkem (Theodor 1948).

Druhy tohoto podrodu jsou nejvýznamnějšími přenašeči *L. infantum* v oblasti Mediteránu (Ready 2010).

➤ *Phlebotomus perniciosus*

Tento druh byl poprvé popsán v roce 1911 z Malty pouze na základě vnějších znaků a porovnáním s *P. papatasi* a *P. minutus*. Ve stejném článku byla popsána i samice nového druhu *P. nigerrimus*, opět pouze dle vnějších znaků a srovnáním s *P. papatasi*. Důležitost se přikládala především mírám částí těla, jejich barvě a chování flebotoma (Newstead 1911). *Phlebotomus nigerrimus* byl synonymizován v roce 1954, jelikož se jednalo pouze o tmavší a ne tak častou variantu *P. perniciosus* (Raynal 1954).

Roku 1913 byl z Korsiky popsán druh *P. legeri* pojmenovaný po profesoru Legerovi (Mansion 1913) a o pět let později Franca popsal druh *P. lusitanicus* z Portugalska. Samci měli jako vždy pět trnů na stylu, dva terminální a další tři přibližně v polovině stylu (Franca 1918). Oba druhy byly roku 1919 synonymizovány s *P. perniciosus* a oba byly pravděpodobně popsány pouze z důvodů nedostatečné morfologické charakterizace a variability znaků druhu *P. perniciosus* (Franca 1919).

Posledním druhem byl *P. grassii* z Itálie popsán roku 1925 Pierantonim (cit. dle Seccombe, Ready *et* Huddleston 1993). Druhy synonymizovali Adler s Theodorem roku 1931, ale popis původního druhu uvádějí s citací Pierantoni 1924 (Adler *et* Theodor 1931).

Tento druh původně zahrnoval velké množství variet, které byly ale v průběhu let povýšeny na úroveň samostatných druhů (*P. langeroni*, *P. longicuspis*, *P. neglectus*, *P. major*, *P. mascitti* a *P. tobbi*). Samci mají na stylu pět silných trnů a u samic najdeme výrazně segmentované spermatéky a armaturu ve farynxu. Zástupci *P. perniciosus* jsou rozšířeni především v západní Evropě a též v severní Africe. Patří mezi velmi významné vektory

viscerální leishmaniózy způsobované *L. infantum* v Mediteránu (Killick-Kendrick 1990) a též se podílejí na přenosu flebovirů působících starosvětskou flebotomí horečku (Depaquit *et al.* 2010).

➤ *Phlebotomus tobbi*

Adler a Theodor jej popsali jako varietu druhu *P. perniciosus* z oblastí Íránu a Izraele a pojmenovali ji po doktoru Tobbovi. Farynx je podobný jako u *P. perniciosus* a spermatéky mají patnáct segmentů a široké spermadukty. Stylus samců nese pět trnů, dva terminální, jeden tenčí a jeden tlustší uprostřed, a poslední za nimi. Varieta *tobbi* se od *P. perniciosus* odlišovala řadou drobných, ale stabilních morfologických znaků a u samců i tvarem aedeagu (Adler, Theodor *et* Lourie 1930), díky čemuž získala o čtyři roky status samostatného druhu (Parrot 1934).

Též v roce 1934 byl objeven druh *P. pirumovi*, Burakova *et* Mirzayan 1934, který byl druhu *P. tobbi* velice podobný, ale odlišoval se aedeagem. Po dalších studiích však byly tyto dva druhy nakonec roku 1941 synonymizovány (Perfilijev 1941 cit. dle Perfilijev 1968).

Phlebotomus tobbi je vektorem kutánní leishmaniózy působené *L. infantum*, která jinak působí viscerální leishmaniózu (Svobodová *et al.* 2009).

❖ podrod *Phlebotomus*

Jméno tohoto podrodu [*Flebotomus*] se poprvé objevilo roku 1840, kdy jej Rondani a Berté použili k označení nového rodu. Typovým druhem zvolili *Bibio* [*Phlebotomus*] *papatasi*, Scopolii 1786 (cit. dle Seccombe, Ready *et* Huddleston 1993). Jako podrod stejnojmenného rodu popsal tuto skupinu až França, když rozdělil tehdy známé zástupce dle samčích genitálií (Franca 1919).

Samci mají dlouhé tenké genitálie, na stylu jsou terminálně tři krátké trny a zbylé dva jsou blíže středu. Na bázi koxitu nejdeme drobný otrněný hrbolem a na paramerách dva dlouhé druhotné otrněné přívěsky, aedeagus je krátký. Samice mají dokonale segmentovanou spermatéku a zvrásněný farynx (Theodor 1948).

➤ *Phlebotomus papatasi*

Samice tohoto druhu byla popsána původně v rámci rodu *Bibio*, Scopolii 1786, ale samec byl popsán až mnohem později v rodu *Flebotomus*, Rondani 1840 a jméno *Phlebotomus papatasi* se poprvé objevilo v roce 1847, když ve stejném článku Loew synonymizoval svůj popis *Haemasson minutus* [= *Sergentomyia minuta*] s popisem *P. papatasi* (cit. dle Sinton 1928b).

V roce 1840 Costa popsal *Cyniphes molesta*, který byl však posléze přejmenován na *Phlebotomus molestus* a konečně roku 1928 oficiálně synonymizován s *P. papatasi*, ačkoliv k tomuto druhu jej řadili autoři, Newstead, již předtím (cit. dle Sinton 1928b). Roku 1941 byla ještě popsána varieta *breviventris*, přestože nebyl nalezen žádný podstatný morfologický rozdíl (Ristorcelli 1941), a tato byla synonymizována roku 1982 Lewisem.

O synonymizaci s *P. papatasi* se uvažovalo ještě v případě *P. angustipennis*, Meijer 1909, z Javy na základě žilkování křídel, ale nakonec byl tento ustanoven samostatným druhem v rámci rodu *Sergentomyia*. Další druh *P. javaensis* je pravděpodobně totožný s *P. angustipennis* (Sinton 1928b).

Tento často synantropní a antropofilní druh se vyskytuje téměř na celém území Starého světa a je prokázaným specifickým přenašečem *L. major* (Killick-Kendrick 1990) a několika virů z rodu *Phlebovirus*, jako jsou Naples a Sicilian viry (Tesh 1988).

❖ podrod *Paraphlebotomus*

Tento podrod popsal v roce 1948 Theodor v rodu *Phlebotomus* a typovým druhem zvolil *P. sergenti*. Samci mají malé genitálie, kde surstylus je delší než koxit a stylus nese čtyři trny, dva spíše terminální a dva blíže bázi. Na koxitu je hrbolek s dlouhými trny a krátký aedeagus je zakončen háčkem. Ve farynxu je výrazná armatura tvořená klínovitými zuby a samice mají segmentovanou spermatéku se zvětšeným posledním článkem (Theodor 1948), s výjimkou u druhu *P. kazeruni*, jehož spermatéky jsou nesegmentované (Lewis 1982).

➤ *Phlebotomus sergenti*

Samce tohoto druhu popsal Parrot roku 1917 z Alžíru a pojmenoval na počest doktorů Edmonda a Etiennea Sergenta. Popis je založen především na mírách palpálních a antenálních segmentů, žilkování křídla a popisu vnějších genitálií, přičemž na stylu jsou dva páry trnů, terminální a subterminální (Parrot 1917). Samici popsal o rok později França z Portugalska, opět pouze dle měření jednotlivých částí těla. Spolu s tímto popisem zveřejnil ještě nový popis samce (França 1918).

V roce 1963 popsal Perfiljev z oblasti Kavkazu a Krymu poddruh *P. sergenti similis* podle podoby bazálního výběžku a délky laterálního lobu (cit. dle Lewis 1982). Tyto dva morfologicky si velice podobné poddruhy, *P. sergenti sergenti* a *P. sergenti similis*, byly rozděleny a povýšeny na druhy na základě morfologických rozdílů vnějších genitálií samců a vzhledu spermaték a armatury farynxu u samic. *Phlebotomus sergenti* má také větší areál rozšíření než *P. similis* (Depaquit, Leger *et Ferte* 1998). Jejich druhový status byl posléze ještě potvrzen pomocí sekvenční difference v genu pro ITS 2 (Depaquit *et al.* 2002).

Morfologicky se tento druh také velice podobá druhům *P. alexandri* a *P. saevus*, které byly původně popsány jako jeho variety (Abonnenc 1972). U *P. sergenti* byly celkem popsány čtyři variety, ale ty se postupně staly všechny samostatnými druhy v podrodu *Paraphlebotomus* (Seccombe, Ready *et* Huddleston 1993).

Rozšíření tohoto druhu zasahuje severněji než oblast rozšíření *P. papatasi* (Adler *et* Theodor 1957) a je také jediným prokázaným specifickým přenašečem komplexu *L. tropica* z podrodu *Paraphlebotomus* (Kamhawi *et al.* 2000).

❖ podrod *Euphlebotomus*

Jako samostatný podrod jej poprvé popsal Theodor v roce 1948 v rámci rodu *Phlebotomus* a za typový druh vybral *P. argentipes*. Samci mají stylus s pěti dlouhými trny, z nichž dva jsou terminální a tři umístěny uprostřed stylu. Aedeagus je kónického tvaru a armatura farynxu tvořena malými zuby a postranními paralelními zářezy. Samice mají spermatéku segmentovanou nebo vroubkovanou s výrazným a zvětšeným terminálním segmentem a jejich farynx je podobný jako u samic z podrodu *Anaphlebotomus* (Theodor 1948).

➤ *Phlebotomus argentipes*

Jedná se o jeden z nejdříve popsáných druhů rodu *Phlebotomus*, který pojmenovali Annandale a Brunetti v roce 1908. Samice a samec *P. argentipes* z oblasti Kalkaty byli sice popsáni detailně, ale pouze na základě vnějšího vzhledu. Pozornost byla věnována proměření všech částí těla a jejich tvaru, zbarvení a křídelní žilnatině (Annandale 1908).

O dva roky později popsal Annandale *P. argentipes* var. *marginatus* podle nálezu jedné samice ze Sri Lanky s odlišnostmi ve větvení křídelní žilnatinou a zbarvení toraxu (Annandale 1910). Sinton posléze tento popis synonymizoval s původním popisem *P. argentipes* s tím, že Annandale neudal žádné morfologické odlišnosti variety (Sinton 1932a). V roce 1923 Sinton podle samce z Madrásu popsal *P. annandalei*, ale už o dva roky později jej také synonymizoval s *P. argentipes* (cit. dle Lewis 1978). Ani u jednoho ze synonymizovaných druhů se nezachovaly preparáty holotypů.

Poslední varietu popsali v roce 1953 Mitra a Roy z Puné v západní části Indie. *Phlebotomus argentipes* var. *glaucus* se odlišovala barvou, křídelní žilnatinou a velikostí morfologických znaků (Mitra *et* Roy 1953). Tato varieta byla posléze synonymizována jako menší forma druhu *P. argentipes* (Lewis 1967).

Ačkoliv byly všechny variety s *P. argentipes* postupně synonymizovány, zdá se, že se ve skutečnosti nejedná o jeden druh, nýbrž o komplex druhů. Tento komplex *P. argentipes* s. l. pravděpodobně zahrnuje alespoň tři příbuzné druhy: *P. argentipes* s. s., Annandale *et*

Brunetti 1908, *Phlebotomus annandalei*, Sinton 1923 a *Phlebotomus glaucus*, Mitra *et* Roy 1953. Toto je podpořeno i jejich rozlišnostmi v chování, rozšíření a pravděpodobně i různou schopností přenášet *L. donovani*. Jediným prokázaným přenašečem viscerální leishmaniózy v Indii tak zůstává *P. argentipes* s. s. (Ilango 2010).

2.6 Použití molekulárních metod k identifikaci flebotomů

Jak už bylo řečeno výše, klasické určování flebotomů, i jiného hmyzu, do druhů na základě morfologických znaků může být značně problematické a identifikace je navíc vázána prakticky jen na dospělá stádia. Morfologické určování také často opomíjí vnitrodruhovou variabilitu či přítomnost kryptických druhů, přičemž oba tyto aspekty jsou velice důležité v případě epidemiologických studií infekčních onemocnění. Tento jev velice dobře dokumentuje různorodost zástupců komplexu *Anopheles gambiae*, kde najdeme jak velmi dobré přenašeče malárie (*A. arabiensis*, *A. gambiae*, *A. merus*), tak ty, kteří nejsou do jejího přenou nijak zapojeni (*A. quadrimaculatus*). Správné druhové určení je pak klíčové k nastavení vhodného programu kontroly vektorů onemocnění (Coetzee, Craig *et* le Sueur 2000).

Právě molekulární metody nám mohou umožnit identifikovat jinak morfologicky nerozeznatelné druhy, případně populace téhož druhu, což může objasnit i jejich různé schopnosti přenášet infekčních onemocnění (Lanzaro *et* Warburg 1995). Správné druhové určení je navíc klíčové i pro popis biodiverzity, potažmo nových druhů. Velkou výhodou molekulárních metod je také potřeba pouze malé části tkáně daného druhu k jeho určení, a nezávislost tohoto určení na stáří, pohlaví a případně i vývojovém stádiu druhu.

2.6.1 Metoda DNA-barcodingu

Tato metoda, díky které můžeme na základě krátkého úseku DNA zvaného „barcode“ identifikovat různé organismy, byla představena v roce 2003 Hebertem a jeho spolupracovníky. Jako standardní „barcodový“ úsek byla vybrána asi 650 bází dlouhá mitochondriální sekvence cytochrom oxidázy I (COI). Oproti jiným molekulárním metodám má tato několik výhod: možnost použití univerzálních primerů, široké spektrum zahrnutých organismů, standardní protokol přípravy, ale především přímé spojení DNA-barcodingu s taxonomií. Problémem však zůstává, že žádný mitochondriální gen nemůže zcela objasnit její komplexitu a pro komplikovanější případy, jako je hybridizace či polyploidní genom, je potřeba doplnit analýzu sekvencemi jaderných genů (Hebert *et al.* 2003). Dalším problémem

může být nemožnost získat jednu univerzální „barcodovou“ sekvenci pro jeden druh. Vzhledem k vnitrodruhové variabilitě tohoto genu získáme vždy různé sekvence pro různé jedince, respektive jedince z různých geografických oblastí rozšíření (Moritz *et al.* 2004). S tím ovšem nesouhlasí výsledek studie provedené na zástupcích řádu Lepidoptera, kde nebyl žádný zásadní vliv geografické vzdálenosti na variabilitu sekvencí zaznamenán (Hebert, de Waard *et al.* 2010).

Gen pro COI byl vybrán především ze dvou důvodů, jednak možnost použití společných primerů pro téměř všechny taxonomické skupiny (Folmer *et al.* 1994), a také pro velkou fylogenetickou informativnost tohoto úseku. Ta je dána vysokou mutační rychlostí, která dovoluje odlišit nejen blízce příbuzné druhy, ale i skupiny uvnitř druhu (Cox *et al.* 2001). Sekvence COI navíc obvykle neobsahuje introny, tudíž alignment je snadný, a jelikož se jedná o kódující úsek, tak i případné chyby mohou být odhaleny překladem sekvence do proteinu (Hebert *et al.* 2003). Přestože byl gen COI brán jako univerzální, ukázal se pro některé organismy, rostliny a houby, nepoužitelný a pro tyto skupiny byly ustanoveny jiné „barcodové“ úseky; v případě rostlin část chloroplastové DNA a u hub vnitřní přepisový mezerník ITS (Jinbo, Kato *et al.* 2011).

Aby bylo možné metodu DNA-barcodingu používat k rutinnímu určování neznámých vzorků, je třeba získat „barcodové“ sekvence co nejvíce druhů. Tyto sekvence jsou ukládány do společné databáze Barcode of Life Data System (BOLD, www.barcodinglife.org) a s tou jsou posléze neurčené sekvence porovnávány (Ratnasingham *et al.* 2007). Tato databáze může v mnohém usnadnit popis nových druhů, díky množství informací, které jsou spolu se sekvencí k danému vzorku připojeny, ale pouze na základě „barcodového“ úseku není možné popsat nový druh. Jedná se tedy o vhodné doplnění klasických taxonomických studií a pomoc pro odhalení kryptických druhů, stejně jako morfologicky různých příslušníků stejného druhu a různých vývojových stadií, což je užitečné především u holometabolního hmyzu, kde se larvální stádia vůbec nepodobají dospělcům (Hajibabaei *et al.* 2007).

Tato metoda byla již úspěšně aplikována na mnoho taxonomických skupin, včetně identifikace příbuzných druhů u řady skupin hmyzu: Lepidoptera (Hajibabaei *et al.* 2006), Isopoda (Markow *et al.* Pfeiler 2010), Diptera, Culicidae (Cywinska, Hunter *et al.* 2006) atd. DNA-barcoding byl použit i k rozlišení morfologicky obtížně určitelných tiplíků (*Culicoides*) ve Švédsku, ale bohužel dva velice blízké druhy se rozlišit nepodařilo a u jiných byla zjištěna vysoká vnitrodruhová variabilita sekvence COI (Ander, Troell *et al.* Chirico 2013). V jiné studii identifikující flebotomy (*Phlebotomus* a *Sergentomyia*) v severním Afganistánu byla místo sekvence COI použita sekvence cytochrom oxidázy b (Cyt b), a to z důvodu použití tohoto

genu v jiných molekulárních studiích (Krueger *et al.* 2011), což komplikuje využitelnost takto získaných výsledků v dalších studiích této skupiny.

2.6.2 Metoda MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Metoda MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) umožňuje ionizovat molekuly a pomocí hmotnostní spektrometrie je posléze analyzovat. V případě metody MALDI-TOF (Time of Flight) je měření citlivější a můžeme detekovat i částice s vyšší molekulovou hmotností.

Princip metody MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je tedy založen na měření rychlosti doby letu ionizovaných molekul, z níž se pak počítá poměr hmotnosti a náboje dané částice. Spektrum je obvykle měřeno v rozsahu přibližně 1000 až 20 000 Da, ale záleží na daném vzorku i typu použité matrice. Ta je vybírána s ohledem na měřené molekuly a záleží tedy, jestli budou analyzovány peptidy, proteiny, lipidy, nukleotidy či oligonukleotidy; a jejím základem je často aromatická kyselina. Měření probíhá na stupnici m/z (hmota/náboj) a v případě jednou nabitých molekul, jak je běžné u MALDI, měříme tudíž jejich reálnou hmotnost.

Extrakce peptidů a proteinů ze vzorku probíhá v kyselém prostředí, získaný extrakt je smíchán s matricí a nanesen na terčík MALDI destičky. Poté, co směs zkrystalizuje, jsou vytvořené krystaly ostřelovány krátkými pulzy laseru, jehož energii absorbuje matrice a svým rozkladem ionizuje molekuly vzorku. V získaném proteinovém profilu význačné píky reprezentují jednotlivé peptidy a proteiny, přičemž pro identifikaci neznámého vzorku není nutná jejich charakteristika. Tato identifikace probíhá srovnáváním celkového proteinového profilu neznámého vzorku s referenčním spektrem. Základním principem aplikace metody MALDI-TOF MS k účelům druhové identifikace je tak unikátnost proteinového profilu každého druhu.

Na rozdíl od metody DNA-barcodingu MALDI-TOF MS nestuduje variabilitu v sekvencích DNA, ale v proteinovém profilu jedinců. Její výhodou je především jednoduchá a rychlá příprava vzorků, stejně jako možnost jejich okamžitého vyhodnocení. Nevýhodou je pak její závislost na použitém materiálu, konkrétně na jeho proteinovém složení. To je u mnohobuněčných organismů závislé především na typu použité tkáně (Hoppenheit *et al.* 2013a). U samic hematofágního hmyzu by také mohlo dojít k ovlivnění spektra nasátou krví, ale v případě měření pouze proteinů hrudi je tento vliv minimální. Navíc takové profily nejsou ovlivněny ani pohlavím, či stářím hmyzu (Kaufmann *et al.* 2011) a zdá se, že i rozdílná potrava má na proteinový profil malý vliv. V případě měření spekter různých vývojových

stádií druhů mšic se spektrum lišilo především svou intenzitou, ale píky charakteristické pro daný druh byly vždy přítomny (Perera, Vargas *et al.* Jones 2005).

Metoda MALDI-TOF MS se ukázala jako užitečná v případě složitějšího určování bakterií a její výsledky byly shodné s výsledky identifikace pomocí sekvenace 16S rRNA (Mellmann *et al.* 2008). Dnes je tato metoda již rutinně a komerčně používána k určování patogenních mikroorganismů v klinických vzorcích (shrnutí v Seng *et al.* 2010). Pro účely rozlišení mnohobuněčných organismů byla nicméně použita teprve relativně nedávno, a to k identifikaci blízkých druhů ze skupiny *Drosophila melanogaster* (Campbell 2005). Výsledky navíc odpovídají i fylogenetickým vztahům uvnitř skupiny, jak ukazuje studie provedená na 13 druzích rodu *Drosophila* (Feltens *et al.* 2009). Od té doby byla metoda MALDI-TOF MS použita u několika medicínsky významných skupin hmyzu: k rozlišení druhů rodu *Culicoides* (Kaufmann *et al.* 2012a), much rodu *Glossina* (Hoppenheit *et al.* 2013a) či komárů různých rodů (Yssouf *et al.* 2013a). Těmto pracím se podrobněji věnuji v kapitole Diskuze v druhé části (Identifikace druhů podčeledi Phlebotominae pomocí MALDI-TOF MS).

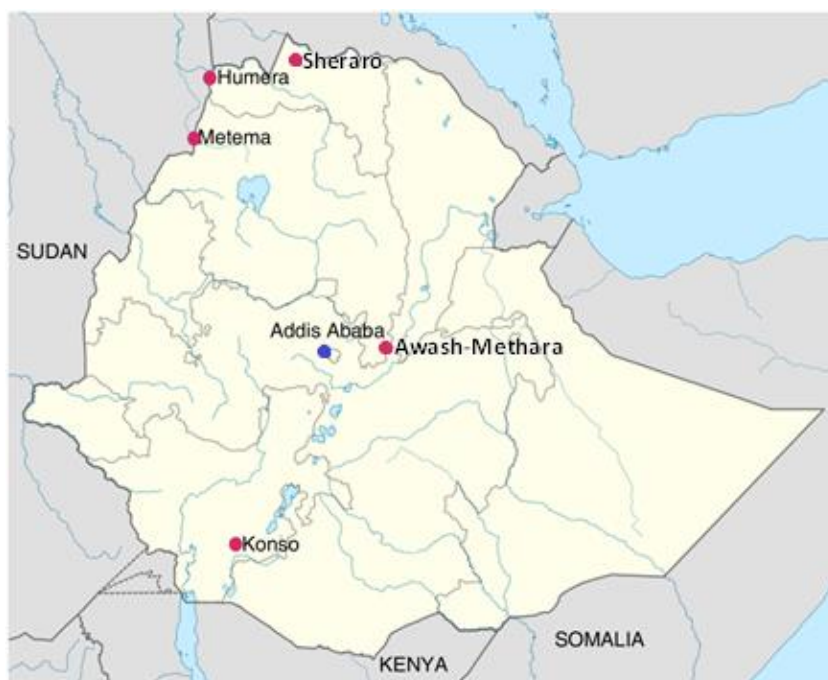
ČÁST 1

Identifikace druhů rodu *Sergentomyia* pomocí DNA-barcodingu

3.1 Materiál a metodika

3.1.1 Sběr materiálu a jeho uchování

Sběry flebotomů byly zajištěny několika členy naší laboratoře a probíhaly v letech 2010-2013 na pěti lokalitách v Etiopii: Awash, Humera, Konso, Metema a Sheraro (obrázek 3.1.1). Flebotomové byli chytáni pomocí CDC světelných pastí, umístěovaných během noci k lidským obydlím, hospodářským zvířatům či volně do krajiny v místech předpokládaných líníšť (termitiště, praskliny v půdě apod.). Následně byli flebotomové roztríděni a skladováni v 96% etanolu pro další analýzy.



Obr. 3.1.1: Mapa s vyznačenými místy odchytu flebotomů v Etiopii (A. Kassahun).

3.1.2 Zalévání preparátů a determinace flebotomů

Chemikálie

- destilovaná voda
- 96% nedenaturovaný etanol (Lach-Ner, s.r.o.)
- zalévací médium CMCP 10 High Viscosity Mountant (Polysciences, Inc.)
- #6372F Euparal Mounting Medium (BioQuip Products, Inc.)

Pod binokulární lupou (Olympus SZX12) byly sběry flebotomů přibližně roztríděny do rodů a zástupci rodu *Sergentomyia* byli dále zpracováni. Jedinci byli rozděleni podle pohlaví a zamontováni do trvalých preparátů. Jednotliví flebotomové byli entomologickou pinzetou přeneseni z 96% nedenaturovaného etanolu do Petriho misky s destilovanou vodou. Každý

jedinec byl posléze umístěn do kapky destilované vody na sklíčku pod binokulární lupou a pomocí pitvacích nástrojů (minucie upevněná do špejle) mu byla oddělena hlava a poslední abdominální články s genitáliemi. Tyto části nesoucí hlavní determinační znaky byly vhodně umístěny na podložní sklíčko do kapky zalévacího média CMCP 10 a překryty krycím sklíčkem. Preparáty byly poté ponechány schnout 48 hodin ve vodorovné poloze při laboratorní teplotě. Zbylá hrud' s částí abdomenu byla uschována v mikrozkuhavce v 96% nedenaturovaném etanolu pro pozdější izolaci DNA. Jednotlivé preparáty a k nim náležející mikrozkuhavky byly opatřeny unikátním kódem.

Zaschlé preparáty zástupců rodu *Sergentomyia* byly pod mikroskopem (Olympus CX31) určovány do druhu, a to při celkovém zvětšení 100x až 400x podle daného determinačního znaku; k identifikaci byly použity určovací klíče pro etiopskou oblast (Abonnenc *et* Minter 1965; Abonnenc 1972).

Při prohlížení starších preparátů však bylo zjištěno, že hlavní determinační znak samic, spermatéky, se po určité době v zalévacím médiu rozpouštějí a tyto preparáty se tak stávají neurčitelnými. Následně proto bylo vyzkoušeno nové zalévací médium, Euparal Mounting Medium, to ale neumožnilo dostatečné prosvětlení preparátů. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto pokračovat s determinací pouze u samců, u nichž jsou podstatné determinační znaky lépe dostupné a časem se nemění. Mezi tyto znaky patří: počet a postavení trnů na stylu, tvar a velikost aedeagu; počet, tvar a velikost zubů a přítomnost, velikost a tvar pigmentové skvrny v cibáriu. Vybrané preparáty všech určených druhů byly později nafoceny na mikroskopu Olympus BX51. Tyto fotografie jsou zde uvedeny pro ilustraci identifikačních znaků daných druhů.

1. podrod *Parrotomyia*

Sergentomyia eremitis



Obr. 3.1.2: Cibárium s 30-35 rovnými zuby v palisádě.

Sergentomyia magna



Obr. 3.1.4: Cibárium s 14-23 rovnými zuby v palisádě.



Obr. 3.1.3: Vnější genitálie s 4 terminálními trny na stylu a dlouhým špičatým aedeagem.



Obr. 3.1.5: Vnější genitálie s 4 terminálními trny na stylu a dlouhým špičatým aedeagem.

2. podrod *Parvidens*

Sergentomyia lesleyae



Obr. 3.1.6: Vnější genitálie s 5 trny na stylu a dvojitou paramerou.



Obr. 3.1.7: Krátký askoid na IV. antenálním článku.

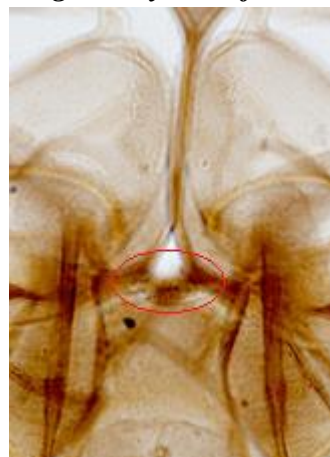
3. podrod *Sergentomyia*

Sergentomyia antennata

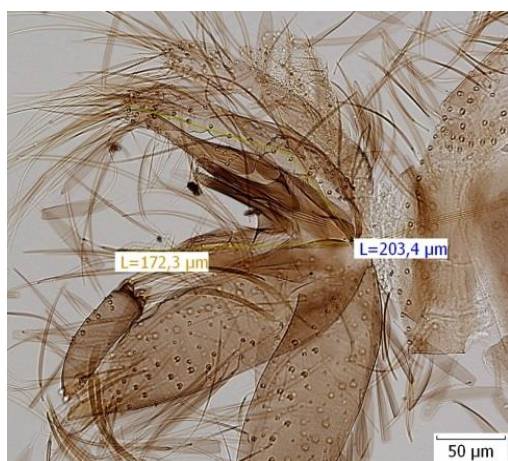


Obr. 3.1.8: Cibárium s 18-20 jehlovitými zuby.

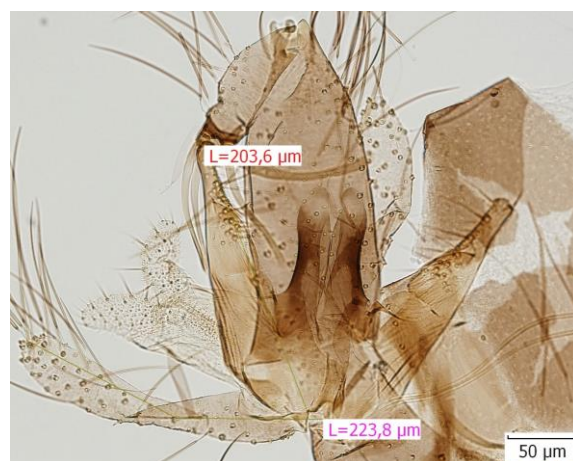
Sergentomyia bedfordi



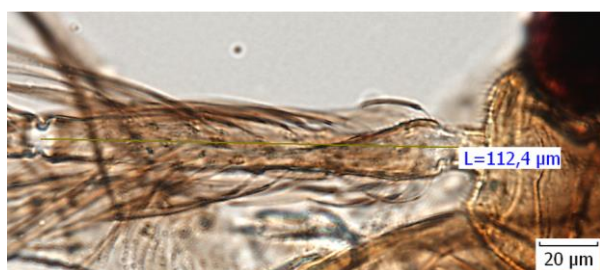
Obr. 3.1.11: Cibárium s 18-20 jehlovitými zuby.



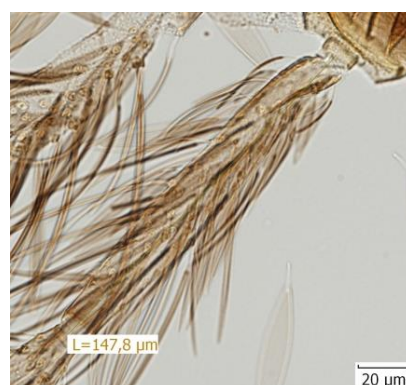
Obr. 3.1.9: Vnější genitálie s 4 terminálními trny na stylu, prstovitým aedeagem a paramerou o 30-50 μm kratší než surstylus.



Obr. 3.1.12: Vnější genitálie s 4 terminálními trny na stylu, prstovitým aedeagem a paramerou o 30-50 μm kratší než surstylus.



Obr. 3.1.10: Kratší III. antenální článek (95-110 μm).



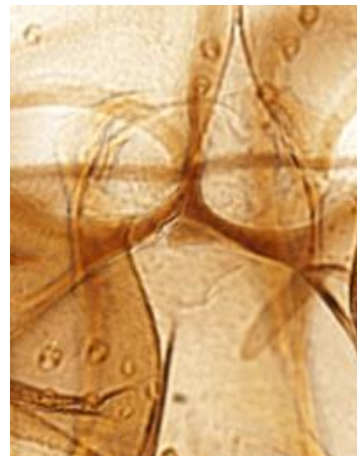
Obr. 3.1.13: Delší III. antenální článek (100-150 μm).

Sergentomyia buxtoni

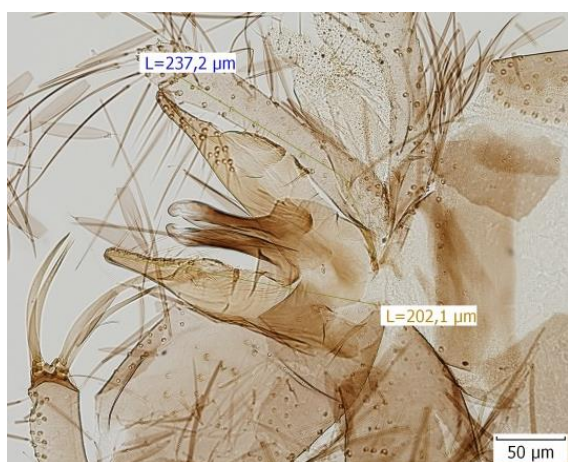


Obr. 3.1.14: Cibárium s řadou zubů a pigmentovou skvrnou.

Sergentomyia cincta



Obr. 3.1.16: Cibárium s 18-20 zuby. (není je vidět)



Obr. 3.1.15: Vnější genitálie s 2 terminálními a 2 subterminálními trny na stylu, prstovitým aedeagem a paramerou o 30-50 μm kratší než surstylus.



Obr. 3.1.17: Vnější genitálie s 4 terminálními trny na stylu, prstovitým aedeagem a paramerou o 30-50 μm kratší než surstylus.



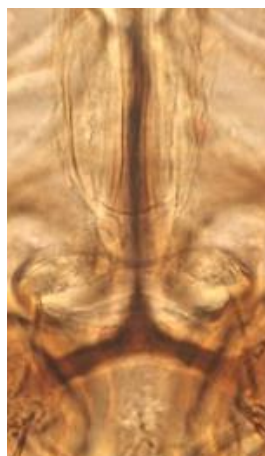
Obr. 3.1.18: Kratší III. antenální článek (95-110 μm).

Sergentomyia schoutedeni

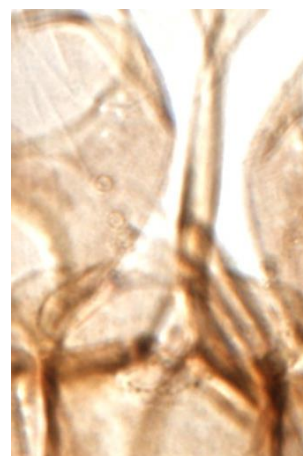


Obr. 3.1.19: Cibárium s rovnými zuby a oválnou pigmentovou skvrnou.

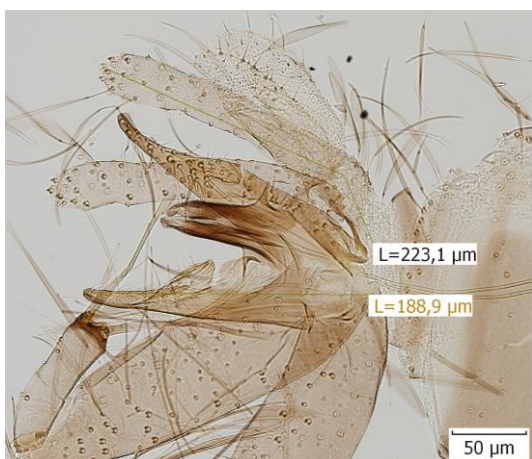
Sergentomyia schwetzi



Obr. 3.1.22: Cibárium typické formy.



Obr. 3.1.23: Cibárium formy Amudat.



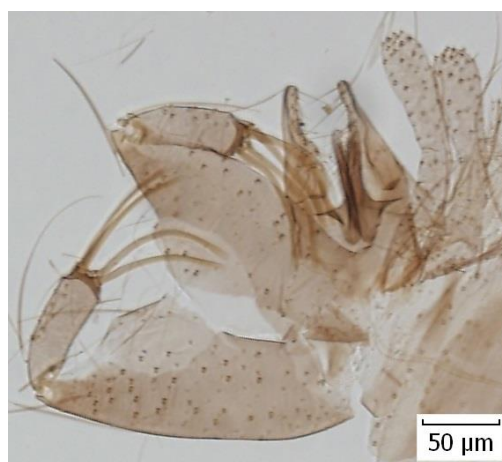
Obr. 3.1.20: Vnější genitálie s 2 terminálními a 2 subterminálními trny na stylu, prstovitým aedeagem a paramerou o 30-50 µm kratší než surstylus.



Obr. 3.1.24: Vnější genitálie typické formy s 2 terminálními a 2 výrazně subterminálními trny na stylu a prstovitým aedeagem.



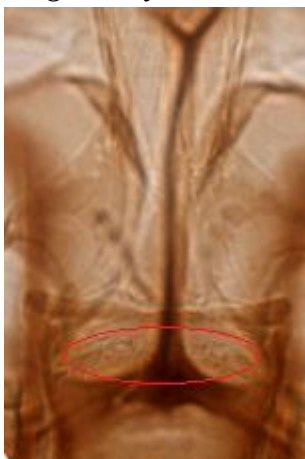
Obr. 3.1.21: Delší III. antenální článek (110-120 µm).



Obr. 3.1.25: Vnější genitálie formy Amudat s 4 terminálními trny na stylu a prstovitým aedeagem.

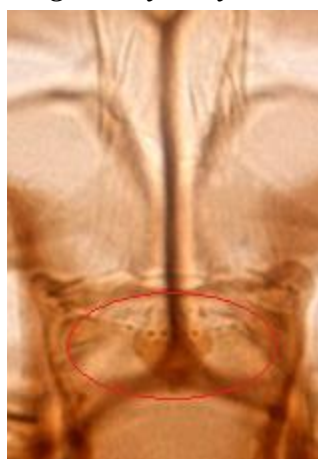
4. podrod *Sintonius*

Sergentomyia adleri



Obr. 3.1.26: Cibárium s 10-12 zuby ve 2-3 řadách a pigmentovou skvrnou.

Sergentomyia clydei



Obr. 3.1.28: Cibárium s 10-15 zuby a srdcovitou pigmentovou skvrnou.



Obr. 3.1.27: Vnější genitálie s 4 terminálními trny na stylu a krátkým špičatým aedeagem.



Obr. 3.1.29: Vnější genitálie s 4 terminálními trny na stylu a krátkým špičatým aedeagem.

3.1.3 Izolace DNA

Abychom porovnali kvalitu izolace DNA, použili jsme pro srovnání dvě metody. DNA byla izolována z hrudi a části abdomenu vybraných jedinců. Izolovaná DNA byla uchovávána ve sterilních 1,5ml mikrozkuřavkách při teplotě 4-6 °C.

3.1.3.1 Izolace DNA pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit

Chemikálie

- PCR voda (Top-Bio, s.r.o.)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic GmbH)
- isopropanol (Sigma-Aldrich)

Hrud' a zbytek abdomenu flebotoma byly přemístěny z 96% nedenaturovaného etanolu do mikrozkuřavky s PCR vodou, kde byly ponechány přibližně 1 až 2 hodiny, aby došlo k vytěsňování etanolu. Dále byl postup izolace DNA shodný s protokolem Isolation of Nucleic Acids from Mammalian Tissue, přiloženým ke kitu High Pure PCR Template Preparation Kit, s jedinou výjimkou, a to prodloužením doby lyzace vzorku v termobloku z 1 hodiny na 2 až 3 hodiny. Pro účinnější lyzaci byl vzorek navíc na začátku homogenizován pomocí sterilních plastových pístů.

3.1.3.2 Solná extrakce DNA

Chemikálie

- PCR voda (Top-Bio, s.r.o.)
- isopropanol (Sigma-Aldrich)
- 70% a 96% nedenaturovaný etanol (Lach-Ner, s.r.o.)
- homogenizační pufr [složení: 100 ml: 0,4M NaCl (2,338 g), 10mM TRIS (0,121 g), 2mM EDTA (0,074 g)]
- 20% sodium dodecyl sulfát práškový (Sigma-Aldrich)
- proteináza K (Roche Diagnostic GmbH)
- 6M NaCl

Hrud' a část abdomenu flebotoma byly přes noc inkubovány v roztoku 400 µl homogenizačního pufru, 40 µl 20% SDS a 8 µl proteinázy K při 60 °C. Poté bylo k tomuto roztoku přidáno 300 µl 6M NaCl a celá směs byla 30 s pečlivě promíchávána na vortexu a posléze stočena v centrifuze na 10 000 g po dobu 30 minut. Po stočení byl supernatant 3 hodiny inkubován v ekvivalentním množství isopropanolu při -20 °C. Následovalo opět

stočení na centrifuze na 10 000 g, po dobu 20 minut při 4 °C. Po tomto točení byl supernatant opatrně odebrán a pelet opláchnut 180 µl 70% nedenaturovaného etanolu. Poslední stočení na centrifuze trvalo 10 minut při 10 000 g a výsledný supernatant byl opatrně odebrán a pelet rozpuštěn v 10 µl PCR vody. (Postup dle publikace Aljanabi *et* Martinez 1997).

3.1.4 Amplifikační reakce

Chemikálie

- Combi PPP Master Mix [složení: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Tag Purple DNA polymerázy, monoklonální anti-Tag DNA polymeráza (38 nM), stabilizátory a aditiva] (Top-Bio, s.r.o.)
- EmeraldAmp GT-PCR Master Mix [přesné složení výrobce neudává] (TaKaRa Bio, Inc.)
- PCR voda (Top-Bio, s.r.o.)
- primery
- vzorek DNA

DNA-barcoding je metoda založená na sekvenaci mitochondriálních genů cytochrom oxidázy I (COI) a cytochrom oxidázy b (Cyt b). Z izolátů DNA zástupců rodu *Sergentomyia* byly vybrány vzorky, u kterých byla provedena amplifikace těchto genů. U některých z těchto vybraných vzorků byla posléze provedena i amplifikace genu pro malou ribosomální podjednotku (SSU). U několika vzorků byla zkoušena i amplifikace oblasti vnitřního přepisovaného mezerníku (ITS2) či genu pro elongační faktor 1α (EF-1α). Objem amplifikační reakce byl nejčastěji 50 µl (přesné složení je uvedeno v tabulce 3.1.1). Primery použité v jednotlivých amplifikačních reakcích jsou uvedeny v tabulce 3.1.2, tučně vyznačeny jsou ty, které poskytovaly dobré výsledky. Primery zvýrazněné kurzívou byly námi navrženy pomocí programu Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>) na základě dříve získané sekvence. Další primery byly převzaty z článků uvedených v téže tabulce. Reakce probíhaly ve dvou termocyclerech, XP cycler (BIOER) a T100TM Thermal cycler (BIO-RAD), a to podle programů navržených pro tyto primery (programy jsou popsány v tabulkách 3.1.3 až 3.1.7).

Tab. 3.1.1: Složení amplifikační reakce.

Master Mix	25 µl
primer F (10 pmol/µl)	2 µl
primer R (10 pmol/µl)	2 µl
vzorek DNA	4 µl
PCR voda	doplnění do objemu 50 µl (17 µl)

Tab. 3.1.2: Přehled použitých primerů.

gen	primer	orientace primeru	sekvence primeru (5'→3')
COI	Lep F (Hajibabaei <i>et al.</i> 2006)	forward	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGC
	Lep R (Hajibabaei <i>et al.</i> 2006)	reverse	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA
	LCO 1490 (Folmer <i>et al.</i> 1994)	forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	HCO 2198 (Folmer <i>et al.</i> 1994)	reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
	SM_SW_F	forward	GGAATAGTNNGAACTTCTTTAAGAAT
	SM_SW_R	reverse	TAAATGTTGRTAWAGAATWGGGT
	SM_DG_F	forward	GGDATARTNGGWACHTCNYTWAGWAT
	SM_DG_R	reverse	TAARTGTTGRTADARAATWGGRT
	COI_F1 (He <i>et al.</i> 2009)	forward	CGCCTAAACTTCAGCCACTT
	COI_R1 (He <i>et al.</i> 2009)	reverse	CCTAAATTAGCTCATGTAGAC
	COI_F2 (Wang <i>et al.</i> 2006)	forward	ATCGCCTAAACTTCAGCCAC
	COI_R2 (Wang <i>et al.</i> 2006)	reverse	TCCATTGCACTAATCTGCCA
	COI_1709Fs (Zhou <i>et al.</i> 2007)	forward	TAATTGGAGGATTTGGAAATTG
	COI_2191R (Zhou <i>et al.</i> 2007)	reverse	CCYGGTAAAATTAATAATAAACTTC
Cyt b	CB1 (Esseghir <i>et al.</i> 2000)	forward	TATGTACTACCATGAGGACAA
	CB3-R3A (Esseghir <i>et al.</i> 2000)	reverse	GCTATTACTCCYCCCTAACTTRTT
	VD1-F	forward	ACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTGT
	VD1-R	reverse	TCTAATATAGATAAAAGAGTAGA
	F-31	forward	TTGAGGRGCTACWGTAATTACWAAT
	F-54	forward	TCTYYTWTCDGCWATTCCTTAYTT
	R-635	reverse	WARRATATARGGRTCTTCWACHGG
	CB3-PDR (Ready <i>et al.</i> 1997)	forward	CAYATTCAACCWGAATGATA
	NIN-PDR (Ready <i>et al.</i> 1997)	reverse	GGTAYWTTGCCTCGAWTTCGWTTATGA
SSU	Medlin A (Medlin <i>et al.</i> 1988)	forward	CTGGTTGATCCTGCCAG
	Medlin B (Medlin <i>et al.</i> 1988)	reverse	TGATCCTTCTGCAGGTTC
	F1 (Aransay <i>et al.</i> 1999)	forward	GCGGTTGATYCTRCCAGT
	R1 (Aransay <i>et al.</i> 1999)	reverse	CYGCAGGTTACCTACRG
ITS2	JTS3 (Depaquit <i>et al.</i> 2000)	forward	CGCAGCTAACTGTGTGAAATC
	C1a (Depaquit <i>et al.</i> 2000)	reverse	CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTC
EF-1α	EF F05 (Parvizi <i>et al.</i> 2007)	forward	CCTGGACATCGTGATTTCAT
	EF R08 (Parvizi <i>et al.</i> 2007)	reverse	CCACCAATCTTG TAGACATCCTG

Tab. 3.1.3: Programy pro COI:

primery (Lep F, Lep R, SM_SW_F, SM_SW_R, SM_DG_F, SM_DG_R)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	03:00
5	94	00:30
	45	01:30
	72	01:00
35	94	00:30
	51	00:30
	72	01:00
1	72	10:00

primery (LCO 1490, HCO 2198)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	01:00
5	94	01:00
	45	01:30
	72	01:30
35	94	01:00
	50	01:30
	72	01:00
1	72	05:00

primery (LCO 1490, HCO 2198)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	95	05:00
5	94	00:40
	45	01:00
	72	01:00
35	94	00:40
	51	01:00
	72	01:00
1	72	07:00

primery (COI_F1, COI_R1, COI_F2, COI_R2)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	03:00
35	94	00:45
	55	00:45
	72	01:00
1	72	05:00

primery (COI 1709Fs, COI 2191R)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	03:00
40	94	00:30
	53	00:45
	72	01:00
1	72	10:00

Tab. 3.1.4: Programy pro Cyt b:

primery (CB1, CB3-R3A, F-31, F-54, R-635, VD1-F, VD1-R)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	03:00
5	94	00:30
	50	00:30
	72	01:00
1	94	00:30
1	55	00:30
1	72	01:00
1	72	10:00

primery (CB3-PDR, NIN-PDR)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	03:00
5	94	00:30
	40	01:30
	68	01:00
35	94	00:30
	44	01:30
	68	01:00
1	68	10:00

Tab. 3.1.5: Programy pro SSU:

primery (Medlin A, Medlin B)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	05:00
40	94	01:00
	55	01:30
	72	01:30
1	72	05:00

primery (F1, R1)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	03:00
35	94	00:15
	50	00:30
	72	01:00
1	72	10:00

Tab. 3.1.6: Program pro ITS2:

primery (JTS3, C1a)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	03:00
40	94	00:30
	63	01:00
	72	01:00
1	72	05:00

Tab. 3.1.7: Program pro EF-1 α :

primery (EF F05, EF F08)

počet opakování	teplota (°C)	čas (min)
1	94	05:00
5	94	00:30
	44	00:30
	72	01:00
30	94	00:30
	48	00:30
	72	01:00
1	72	10:00

3.1.5 Elektroforéza

Chemikálie

- TAE pufr (AppliChem GmbH, BioChemica)
- agaróza (Invitrogen Ltd.)
- SybrSafe DNA gel stain (Invitrogen Ltd.)
- GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas Life Science)
- produkt PCR

Část PCR produktu byla po dokončení amplifikační reakce nanášena na horizontální gelovou elektroforézu pro kontrolu úspěšnosti amplifikace. Množství nanášeného PCR produktu bylo zpravidla 10 μ l, ale v případě polovičního objemu amplifikační reakce bylo nanášeno jen 5 μ l. Elektroforéza byla provedena na 1% agarózovém gelu s přidáním barvivem SYBR Safe. Pro

identifikaci velikosti PCR produktu byl spolu s ním na gel nanesen také velikostní standard TM 100 bp DNA Ladder Plus. Výsledek elektroforézy byl poté vizualizován pod UV lampou a vyfocen.

V několika případech byl na gel nanesen celý objem PCR produktu, výsledné specifické pruhy DNA pak byly vyříznuty z gelu pod UV lampou pomocí sterilního skalpelu a přečištěny jedním z dále uvedených způsobů.

3.1.6 Přečištění PCR produktu a sekvenační reakce

Přečištění PCR produktu bylo prováděno dvěma různými způsoby.

3.1.6.1 Přečištění PCR produktu pomocí High Pure PCR Product Purification Kit

Chemikálie

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH)
- isopropanol (Sigma-Aldrich)
- PCR voda (Top-Bio s.r.o.)

V případě, že na elektroforézu bylo použito 10 µl PCR produktu, bylo zbylých 40 µl přečištěno podle protokolu Purification of PCR Product in Solution after Amplification přiloženého k High Pure PCR Product Purification Kit. Jedinou výjimkou bylo, že přečištěný PCR produkt byl namísto do 100 µl elučního pufru eluován do 20 µl PCR vody.

Pokud byl na gel nanesen celý PCR produkt, byl po vyříznutí z gelu přečištěn podle protokolu Purification of DNA Fragments from Agarose Gel a výsledný produkt byl opět eluován pouze do 20 µl PCR vody.

3.1.6.2 Přečištění PCR produktu pomocí přesrážení etanolem

Chemikálie

- 3M acetát sodný (NaOAc) (Sigma-Aldrich)
- 96% a 70% nedenaturovaný etanol (Lach-Ner, s.r.o.)
- PCR voda (Top-Bio s.r.o.)

V některých případech se přečištění PCR produktu pomocí kitu ukázalo jako nedostatečné, proto bylo zvoleno přesrážení produktu etanolem. V poměru 10 µl : 1 µl : 28 µl byl smíchán PCR produkt, 3M acetát sodný a 96% nedenaturovaný etanol, tato směs byla ponechána 15 minut při laboratorní teplotě. Poté byly 1,5ml mikrozkušavky 20 minut točeny na 13 400 g, výsledný supernatant byl opatrně odstraněn a precipitát na dně byl opláchnut 100 µl

70% nedenaturovaného etanolu. Směs byla točena na 13 400 g po dobu 15 minut. Supernatant byl opět opatrně odstraněn a mikrozkuhavky byly ponechány dokonale vyschnout na stole při laboratorní teplotě. Precipitát na dně byl posléze rozpuštěn ve 20 µl PCR vody.

Po přečištění byla koncentrace a čistota DNA v PCR produktu změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop ND-1000, Thermo SCIENTIFIC) a 5-10 ng na 100 bp bylo použito pro sekvenační reakci. Množství DNA v sekvenační reakci bylo doplněno PCR vodou spolu s 1 µl 10 pmol/µl primeru do 8 µl. Reakce byly míchány zvlášť pro forward a pro reverse primer a takto připraveny byly poté odeslány na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK. Ta byla provedena na jednom ze dvou analyzátorů, čtyřkapilárním 3130 Genetic Analyzer nebo šestnáctikapilárním 3130xl Genetic Analyzer (oba Applied Biosystems).

3.1.7 Analýza sekvencí a tvorba alignmentů

Použité programy

- BioEdit
- BLASTn (server <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)
- DNASTar - SeqMan, EditSeq
- Kalign (server <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/>)
- ClustalW2 (server <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)
- Notepad

Výsledné sekvence v podobě fluorescenčních křivek byly vizuálně zkontrolovány v programu BioEdit a případně ověřeny pomocí BLASTn. V programu SeqMan byly sekvence z jednoho vzorku vzájemně spojeny, byly z nich odstraněny chyby a sekvence primerů. Upravené sekvence byly uloženy ve FASTA formátu a do následných analýz byly zahrnuty též sekvence získané z databáze GenBank (202.0) na serveru NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alignment všech sekvencí byl proveden pomocí programu Kalign nebo ClustalW2 a manuálně upraven v programu BioEdit. Úpravy zahrnovali především zkrácení sekvencí na přibližně stejnou délku a v případě nekompletních sekvencí doplnění znaku „N“.

3.1.8 Konstrukce fylogenetických stromů

Použité programy

- PhyML
- Modeltest
- MrBayes
- TreeView
- CorelDraw

Pro konstrukci fylogenetických stromů bylo použito metody maximální věrohodnosti (ML) v programu PhyML a bayesovské metody v programu MrBayes v. 3.1.2. Pro ML bylo použito parametrů získaných pomocí programu Modeltest (TrNef+I+ Γ) a pomocí bootstrapu 1000 (ML) replikátů byla zjištěna statistická podpora topologie jednotlivých větví. Program MrBayes byl nastaven na 5 milionů generací se čtyřmi řetězci (dva nezávislé výpočty), byl použit evoluční model GTR+I+ Γ při povolení různých mutačních rychlostí (Vacmodel=4by4, nst=6, rates=invgamma, covarion=yes). Přibližně první čtvrtina všech stromů byla odstraněna jako „burning“ (odpovídá odchylce obou analýz nad 1 %; přesný počet odstraněných stromů byl určen vizualizací odchylek pomocí programu Excel). Výsledné fylogenetické stromy byly zobrazeny programem TreeView a upraveny v programu CorelDraw.

3.1.9 Pokusy s druhem *Sergentomyia schwetzi*

Pokusy byly prováděny s laboratorní kolonií *S. schwetzi* typická forma (Etiopie) sítě jednou týdně na myši. Larvy byly chovány v sádrových kelímcích v termostatu při teplotě 25 °C a vlhkosti 70 % a dospělci byli poté vypouštěni do nylonových sítí a krmeni 50% roztokem přírodního hnědého cukru a destilované vody. Tyto sítě jsou uloženy v teplotě 25 °C a vlhkosti 70 %.

3.1.9.1 Autogenie samic *Sergentomyia schwetzi*

Dospělci, 50 samců spolu s 50 samicemi, byli vypuštěni do nylonové sítě a krmeni pouze cukerným roztokem, bez možnosti sát krev na hostiteli. Sít byla uložena v termostatu při teplotě 25 °C. Po pěti dnech byly samice pomocí exhaustoru přemístěny do sádrou vylitého kelímku, kde by se mohly vyklást.

3.1.9.2 Partenogeneze samic *Sergentomyia schwetzi*

Padesát kukel bylo pomocí štětečku přemístěno ze sádrového kelímku, kde se vyvíjely, po jedné do skleněných falkon překrytých nylonem. Falkony byly umístěny do plastového boxu s vlhkým pískem a ten do termostatu s teplotou 25 °C. Falkony byly průběžně kontrolovány a vylíhlé samice sledovány, zda se vykladou.

3.1.9.3 Vývoj larev *Sergentomyia schwetzi* při různých teplotách

Nasáté samice spolu se samci byli pomocí exhaustoru rozděleni (30 samic na kelímek) do čtyř sádrou vylitých kelímků. Dva kelímky byly dány do plastového boxu s vlhkým pískem a umístěny v termostatu při teplotě 30 °C, druhé dva byly uloženy stejným způsobem při teplotě 20 °C. Po 25 dnech byly kelímky z 20 °C přesunuty do termostatu s teplotou 25 °C a o 10 dní později, po vylíhnutí larev prvního instaru (L1), byl jeden kelímek vrácen do teploty 20 °C a druhý ponechán v teplotě 25 °C.

Celý vývoj od vykladení vajec až po vylíhnutí dospělců byl pečlivě, třikrát týdně, sledován. Vylíhnutí samci byli zaliti do CMCP 10 zalévacího média a posléze prohlédnuti pod mikroskopem (Olympus CX31) pro případné morfologické odlišnosti způsobené rozdílnými teplotami při vývoji.

4.1 Výsledky

4.1.1 Morfologické určení zástupců rodu *Sergentomyia*

Sběry flebotomů pocházely ze tří endemických oblastí VCL (Humera, Metema a Sheraro) na severu Etiopie a z oblastí Awash a Konso. Všichni zástupci rodu *Sergentomyia* byli vytrženi a do trvalých preparátů jich celkem bylo zalito 536, z nichž 323 bylo samců a 213 samic. Morfologicky byli posléze určováni jen samci, jelikož u samic došlo v prvním zalévacím médiu k rozpuštění spermaték, základních určovacích znaků, a druhé médium nedostatečně prosvětlovalo jejich těla.

Dle morfologie byly pomocí určovacího klíče (Abonnenc *et* Minter 1965) identifikovány čtyři druhy náležející do čtyř podrodů a dva komplexy druhů. Zástupci byli určováni na základě klasických morfologických znaků na hlavě (cibárium, farynx, antény, palpy) a znaků vnějších genitálií. Určené druhy a komplexy byly:

- ❖ podrod *Parrotomyia*: *S. africana* komplex druhů*
- ❖ podrod *Parvidens*: *S. lesleyae*
- ❖ podrod *Sergentomyia*: *S. antennata*, *S. schwetzi* typická a zástupci komplexu *antennata***
- ❖ podrod *Sintonius*: *S. adleri*, *S. clydei*

* komplexem *africana* jsou zde myšleny druhy, které bývaly poddruhy *S. africana* a jsou si morfologicky velmi podobné: *S. africana africana*, *S. eremitis* a *S. magna*

** jako komplex *antennata* jsou zde pro zjednodušení označovány druhy *S. antennata*, *S. bedfordi*, *S. buxtoni*, *S. cincta*, *S. dubia* a *S. schoutedeni*, které jsou si morfologicky velice podobné, těmto zástupcům je popisem velmi podobný i druh *S. schwetzi* forma *Amudat*

Nejpočetněji zastoupenými druhy ze všech sběrů byli jedinci *S. clydei* a *S. antennata*. Velkou část sběrů též tvořili zástupci komplexu *africana* podrodu *Parrotomyia*. Nejméně zastoupeným podrodem pak byla skupina *Parvidens* jen s 15 zástupci *S. lesleyae*, a to pouze z oblasti Humery, ostatní druhy se v různých počtech vyskytovaly ve sběrech ze všech oblastí. V tabulkách 4.1.1 až 4.1.7 je seznam kódů a morfologických určení zástupců, jejichž sekvence byly analyzovány. Seznam všech určených jedinců je v kapitole 8 Příloha, str. 110.

Po analýze sekvencí genu pro COI, kdy došlo k rozdělení zástupců komplexu *africana* na dva klady a druhů z komplexu *antennata* dokonce na čtyři samostatné skupiny, byla zopakována analýza morfologických znaků. Tentokrát byly vybrané vzorky vyfotografovány, proměřeny a klasifikovány pomocí jiného určovacího klíče (Abonnenc 1972). Bylo identifikováno šest nových druhů spadajících do dvou podrodů:

- ❖ podrod *Parrotomyia*: *S. eremitis*, *S. magna*
- ❖ podrod *Sergentomyia*: *S. bedfordi*, *S. buxtoni*, *S. cincta*, *S. schoutedeni*

Tyto čtyři nově určené druhy podrodu *Sergentomyia* byly nalezeny pouze ve sběrech z oblasti Konso na jihu Etiopie. Celkem bylo tedy na základě morfologie určeno 11 druhů ze čtyř podrodů.

Tab. 4.1.1: Seznam kódů a morfologických určení jedinců z oblasti Humery.

LOKALITA: Humera (May Cadera)				
KÓD	PRVNÍ URČENÍ	COI	CYT B	DRUHÉ URČENÍ
HMm5	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. eremitis</i>
HMm22	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. eremitis</i>
HMm63	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. eremitis</i>
HMm64	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. eremitis</i>
HMm67	antennata komplex	SM_SW		<i>S. schwetzi</i> (Amudat)
HMm94	<i>S. lesleyae</i>		CB3-NIN	<i>S. lesleyae</i>
HMm95	<i>S. lesleyae</i>	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. lesleyae</i>
HMm116	<i>S. lesleyae</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. lesleyae</i>
HMm126	<i>S. lesleyae</i>	SM-SW		<i>S. lesleyae</i>
HMm134	antennata komplex	SM_SW		<i>S. schwetzi</i> (Amudat)
HMm139	antennata komplex		CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
HMf61	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. eremitis</i>
HMf62	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. eremitis</i>
H3m10	<i>S. africana</i>	SM_SW		<i>S. eremitis</i>
H3m17	<i>S. adleri/clydei</i>	SM_SW		<i>S. clydei</i>
H6m1	<i>S. clydei</i>	SM_SW		<i>S. clydei</i>
H6m2	<i>S. schwetzi</i>		CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
H6m4	<i>S. schwetzi</i>	SM_SW	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
H6m5	<i>S. schwetzi</i>		CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
H6m10	antennata komplex	Lep	CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
H6m18	<i>S. africana</i>	SM_SW		<i>S. magna</i>
H6m28	<i>S. lesleyae</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. lesleyae</i>
H6m29	antennata komplex		CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
H6m31	<i>S. schwetzi</i>		CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
H6m36	<i>S. lesleyae</i>		CB3-NIN	<i>S. lesleyae</i>

Tab. 4.1.2: Seznam kódů a morfologických určení jedinců z oblasti Metemy.

LOKALITA: Metema (Koki)				
KÓD	PRVNÍ URČENÍ	COI	CYT B	DRUHÉ URČENÍ
H7m1	<i>S. adleri/clydei</i>	LCO-HCO		<i>S. clydei</i>
H7m3	<i>S. adleri</i>	LCO-HCO		<i>S. clydei</i>
M8cm3	<i>S. schwetzi</i>	LCO-HCO		<i>S. schwetzi</i>

Tab. 4.1.3: Seznam kódů a morfologických určení jedinců z oblasti Sherara.

LOKALITA: Sheraro (Aluduba)				
KÓD	PRVNÍ URČENÍ	COI	CYT B	DRUHÉ URČENÍ
SAm10	<i>S. africana</i>	Lep		<i>S. magna</i>
SAm13	antennata komplex	SM_SW		<i>S. schwetzi</i> (Amudat)
SAm23	<i>S. antennata</i>		CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
SAm27	antennata komplex		CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
SAm28	<i>S. antennata</i>	Lep		<i>S. antennata</i>
SAm53	<i>S. antennata</i>	Lep		<i>S. antennata</i>
SAm54	<i>S. africana</i>	Lep		<i>S. magna</i>
SAm69	antennata komplex	Lep		<i>S. antennata</i>
SAm75	<i>S. antennata</i>	Lep		<i>S. antennata</i>
SAm89	<i>S. africana</i>	Lep		<i>S. magna</i>
SAm90	<i>S. schwetzi</i>	SM_SW		<i>S. schwetzi</i>
SAm94	<i>S. antennata</i>	Lep		<i>S. antennata</i>
SAm105	antennata komplex	SM_SW		<i>S. schwetzi</i> (Amudat)
SAm108	<i>S. antennata</i>	LCO-HCO		<i>S. antennata</i>
SAm111	antennata komplex	Lep		<i>S. antennata</i>
SAm123	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. magna</i>
SAm124	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. magna</i>
SAm132	<i>S. africana</i>	Lep		<i>S. magna</i>
SAm141	<i>S. antennata</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
SAm142	<i>S. africana</i>	Lep		<i>S. magna</i>
SAm148	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. magna</i>
SAm151	antennata komplex	Lep	CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
SAm170	antennata komplex	Lep	CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
SAm186	antennata komplex	Lep	CB3-NIN	<i>S. antennata</i>

Tab. 4.1.4: Seznam kódů a morfologických určení jedinců z oblasti Sherara.

LOKALITA: Sheraro (Shele)				
KÓD	PRVNÍ URČENÍ	COI	CYT B	DRUHÉ URČENÍ
S1am5	<i>S. africana</i>	Lep		<i>S. magna</i>
S1am7	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. magna</i>
S1am8	<i>S. africana</i>	LCO-HCO		<i>S. magna</i>
S1am11	<i>S. schwetzi</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
S1am12	<i>S. adleri</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. adleri</i>
S1am16	<i>S. africana</i>	SM_SW		<i>S. magna</i>
S1am21	<i>S. antennata</i>	Lep		<i>S. antennata</i>
S1af2	<i>S. schwetzi</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
S1af3	<i>S. africana</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. magna</i>
S1af4	?	Lep	CB3-NIN	<i>Sintonius</i>

Tab. 4.1.5: Seznam kódů a morfologických určení jedinců z naší laboratorní kolonie.

LOKALITA: laboratorní kolonie (původ Sheraro)				
KÓD	PRVNÍ URČENÍ	COI	CYT B	DRUHÉ URČENÍ
Ss1M	<i>S. schwetzi</i>	SM_SW	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
Ss3M	<i>S. schwetzi</i>	SM_SW		<i>S. schwetzi</i>
Ss1G	<i>S. schwetzi</i>	SM_SW	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
Ss3G	<i>S. schwetzi</i>	SM_SW		<i>S. schwetzi</i>
SW	<i>S. schwetzi</i>	SM_SW		<i>S. schwetzi</i>

Tab. 4.1.6: Seznam kódů a morfologických určení jedinců z oblasti Awashe.

LOKALITA: Awash				
KÓD	PRVNÍ URČENÍ	COI	CYT B	DRUHÉ URČENÍ
M70	<i>S. clydei</i>	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. clydei</i>
M76	<i>S. africana</i>	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. eremitis</i>
M80	antennata komplex	Lep	CB3-NIN	<i>S. bedfordi</i>
M112	<i>S. schwetzi</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
M113	<i>S. schwetzi</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
M114	<i>S. schwetzi</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
Jm50	antennata komplex		CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i> (Amudat)

Tab. 4.1.7: Seznam kódů a morfologických určení jedinců z oblasti Konsa.

LOKALITA: Konso (Abaroba)				
KÓD	PRVNÍ URČENÍ	COI	CYT B	DRUHÉ URČENÍ
M11	<i>S. schwetzi</i>	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
M19	antennata komplex	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. buxtoni</i>
M24	antennata komplex	SM_SW	CB3-NIN	<i>S. buxtoni</i>
M34	antennata komplex	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. buxtoni</i>
M35	antennata komplex	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
M36	antennata komplex	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. schoutedeni</i>
M40	antennata komplex	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. cincta</i>
M41	antennata komplex	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. bedfordi</i>
M45	antennata komplex	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
M48	antennata komplex	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. cincta</i>
M49	antennata komplex	LCO-HCO	CB3-NIN	<i>S. buxtoni</i>
M53	antennata komplex	Lep		<i>S. schoutedeni</i>
M54	<i>S. schwetzi</i>	Lep	CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i>
M201	antennata komplex		CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
M202	antennata komplex		CB3-NIN	<i>S. antennata</i>
M205	antennata komplex		CB3-NIN	<i>S. schwetzi</i> (Amudat)

4.1.2 Sekvenační analýza zástupců rodu *Sergentomyia*

Z celkem 185 vybraných jedinců, 14 samic a 171 samců, byla izolována DNA pomocí dvou uvedených metod a následně provedena amplifikace několika genů (COI, Cyt b, EF-1 α , ITS2, SSU). Fylogenetické stromy byly posléze konstruovány pouze na základě sekvencí genů COI a Cyt b, jelikož u ostatních genů se nepodařilo získat dostatek kvalitních sekvencí. Jedinci, u nichž se nám podařila sekvenace obou zmíněných genů, jsou ve fylogramech označeny symbolem *.

U sekvenace genu malé ribosomální podjednotky (SSU) jsme opakovaně dostali sekvence odpovídající kontaminaci kvasinkami rodu *Candida* (zjištěno pomocí BLASTn) a pouze pět sekvencí zástupců rodu *Sergentomyia*. V případě sekvencí vnitřního přepisového mezeríku (ITS2) pak chromatogram ukazoval na pravděpodobné dvojité čtení dané oblasti a vzhledem k nízké koncentraci DNA v získaném produktu amplifikační reakce genu pro elongační faktor 1 α (EF-1 α) nebyly dané vzorky sekvenovány.

Další sekvence zástupců rodu *Sergentomyia* byly pro doplnění fylogenetické analýzy staženy z databáze GenBank, ve stromech jsou označeny symbolem GB, a několik jedinců druhu *S. clydei* bylo již dříve sekvenováno členy naší laboratoře, označeny jsou zkratkou wt.

4.1.2.1 Sekvenační analýza cytochrom oxidázy I

Pro amplifikaci genu pro COI bylo použito postupně sedm různých párů primerů, přičemž amplifikace se nám povedla pouze se třemi z nich (viz kapitola 3.1 Materiál a metodika, str. 40). Ukázka délek amplifikovaných částí genu jednotlivými primery a místa nasednutí těchto primerů jsou znázorněny na obrázku 4.1.1, z něhož je patrné, že všechny použité primery amplifikovaly stejnou část genu COI. Fylogenetický strom byl posléze konstruován bayesovskou metodou z alignmentu sekvencí o délce 651 bázevých párů a jako outgroup byli použiti zástupci rodu *Psychoda*.

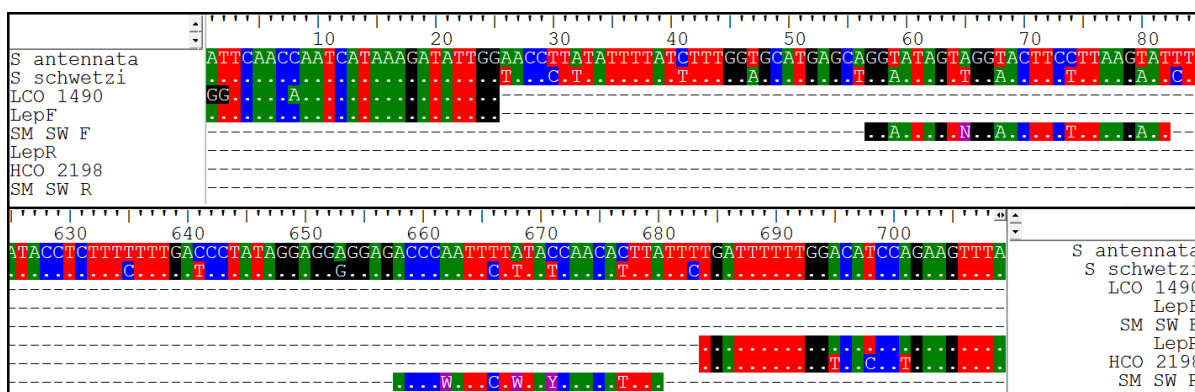
Přestože amplifikace genu pro COI byla provedena u 165 izolovaných vzorků, podařilo se nám získat jen 77 dostatečně kvalitních sekvencí. Ty se rozdělily do 11 samostatných kladů v rámci skupiny rodu *Sergentomyia* a druh *S. lesleyae* pak vytvořil vlastní klad jako sesterská skupina rodu *Phlebotomus*. Dle této analýzy je novosvětský rod *Lutzomyia* bližší rodu *Phlebotomus* než rodu *Sergentomyia*. Celý fylogenetický strom je na obrázku 4.1.2. Jednotlivé druhy jsou označeny barvami podle jejich zařazení do podrodů.

Podle tohoto fylogramu se zahrnuté podrody rodu *Sergentomyia* zdají být parafyletické a podrod *Parvidens* dokonce tvoří samostatnou skupinu na úrovni rodu, ovšem podpora této větve je velmi malá, stejně jako u většiny ostatních na tomto stromě.

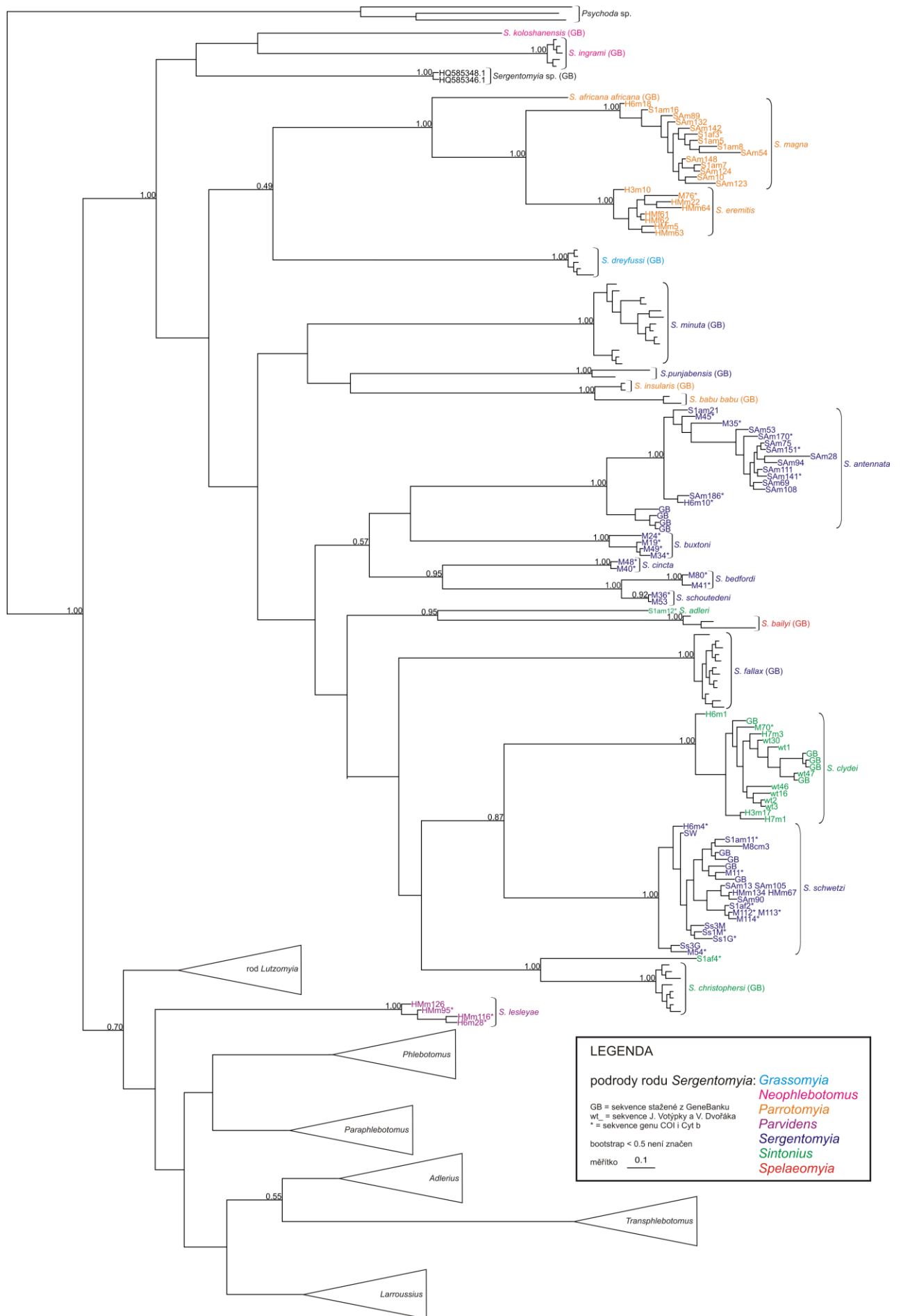
Zástupci podrodu *Parrotomyia* se rozdělili na dva druhy, oba z komplexu *africana*: *S. eremitis* a *S. magna*. Až na dvě výjimky, sekvence H6m18 a M76, jsou tyto skupiny rozděleny i dle geografického původu; zástupci *S. eremitis* pocházejí ze sběrů z Humery a jedinci druhu *S. magna* naopak z odchytů ze Sherara.

Druhy podrodu *Sergentomyia* se rozdělily do šesti různých kladů, z čehož zástupci skupiny *antennata*, kteří jsou si morfologicky velice podobní, jsou si blízcí i dle fylogenetické analýzy. V rámci druhu *S. antennata* se zřetelně vyčleňují samci chycení v Sheraru (kód SAm_) a zároveň se všichni námi sekvenovaní zástupci liší od těch, jejichž sekvence byly staženy z GenBanku, ti byli chyceni v Alžírsku. Vzdálená druhům komplexu *antennata* je skupina zástupců *S. schwetzi*. Dle morfologie se jedná o zástupce typické formy druhu, zároveň však v tomto kladu najdeme i čtyři sekvence (HMm67, HMm134, SAm13, SAm105), které patří jedincům, kteří by dle morfologie mohli odpovídat popisu samců *S. schwetzi* forma *Amudat*.

Podrod *Sintonius* je na fylogramu též rozdělen, a to na tři vzdálené klady. Největší je tvořen zástupci *S. clydei*, v němž se námi sekvenovaní jedinci, na rozdíl od druhu *S. antennata*, promíchali se sekvencemi zástupců chycených v Alžírsku, které byly staženy z GenBanku. Od druhu *S. adleri* se nám podařilo získat pouze jedinou sekvenci. Poslední skupinu pak tvoří sekvence Slaf4, která nebyla morfologicky určena, jelikož se jedná o samici, dle analýzy pomocí BLAST však byla označena jako velmi podobná *S. christophersi* podrodu *Sintonius*.



Obr. 4.1.1: Místa nasednutí primerů na sekvenci genu pro COI, jimiž amplifikované úseky byly použity na fylogenetickou analýzu.



Obr. 4.1.2: Fylogenetický strom rodu *Sergentomyia* konstruovaný na základě sekvencí pro COI bayesovskou metodou.

4.1.2.2 Sekvenační analýza cytochromu b

Při této analýze byl fylogenetický strom také konstruován pomocí bayesovské metody, a to z alignmentu sekvencí o různé délce. Vzorky, u nichž byla provedena sekvenace celé délky genu, jsou dlouhé 869 párů bází, u většiny vzorků, včetně mých, však byla amplifikována pouze PDR část genu o délce 489 párů bází, tyto sekvence začínají na pozici 380. nukleotidu. Sekvence zahrnuté do analýzy byly amplifikovány pouze jedním párem primerů (viz kapitola 3.1 Materiál a metodika, str. 40) a jako outgroup byla použita skupina rodu *Lutzomyia*.

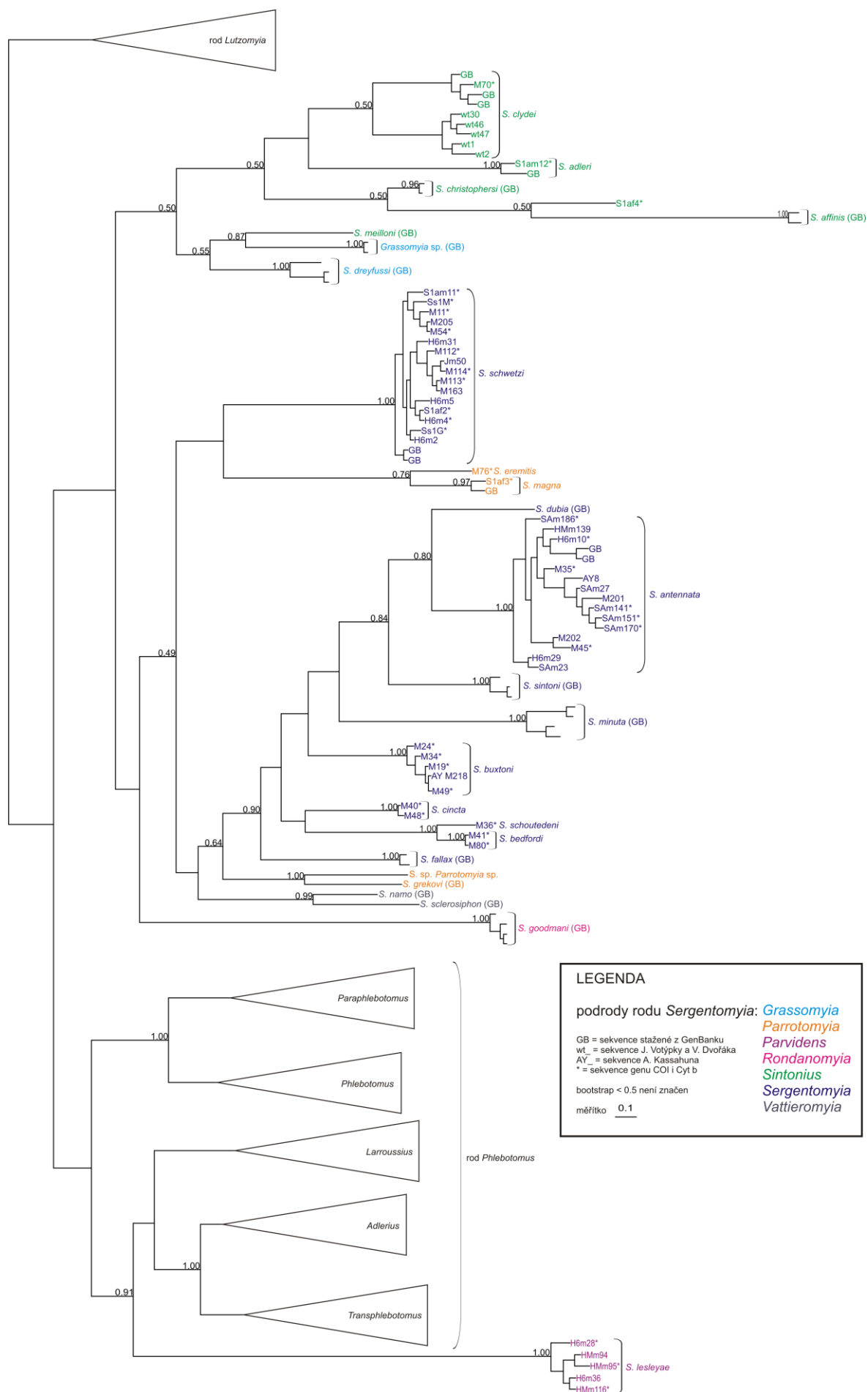
Amplifikováno bylo 150 izolovaných vzorků a získali jsme pouze 47 dostatečně kvalitních sekvencí, které se v souladu se sekvenační analýzou genu COI, rozdělily do 11 kladů v rámci skupiny rodu *Sergentomyia* a druh *S. lesleyae* opět vytvořil vlastní klad, tentokrát však uvnitř rodu *Phlebotomus*. Celý fylogenetický strom je na obrázku 4.1.3.

Dle této analýzy jsou jednotlivé podrody rodu *Sergentomyia* opět parařfyletické, přesto jsou si některé druhy z podrodů blíže nežli na fylogenetickém stromě dle COI. Patrné je to především u podrodu *Sintonius*, kde druhy *S. adleri* a *S. clydei* tvoří sesterské skupiny, od nichž se odvětvují *S. christophersi* a *S. affinis*, spolu s neurčenou sekvencí S1af4. Do podrodu *Sintonius* patří ještě *S. meilloni*, ta však klastruje s jedinci podrodu *Grassomyia*.

Podrod *Parrotomyia* zůstal parařfyletický, ale zástupci komplexu *africana* se opět rozdělili do dvou sesterských druhů: *S. eremitis* a *S. magna*. V rámci podrodu *Sergentomyia* jsou si opět velmi blízké druhy komplexu *antennata* a velmi vzdálený jim je druh *S. schwetzi*. Tato skupina zahrnuje samce typické formy druhu, ale dva jedinci (sekvence Jm50, M205), byli dle morfologie určeni jako zástupci komplexu *antennata*. Mohlo by se jednat o samce formy *Amudat* druhu *S. schwetzi*. U druhu *S. antennata* pak oproti fylogramu COI nenajdeme vyčleněnou populaci z Sherara a ostatní druhy tohoto podrodu se rozdělily stejně jako v předchozí analýze.

Na rozdíl od analýzy dle COI, zde se podrod *Parvidens* začlenil do rodu *Phlebotomus* jako jeden z jeho podrodů. Podpora této větve je sice silnější než v předchozím případě, ale i tak je v rámci tohoto fylogenetického stromu podpora jednotlivých větví nízká.

Na základě obou fylogenetických analýz, byly druhy komplexů *africana* a *antennata* opět morfologicky identifikovány, jejich druhové označení však může být nejisté, jelikož samci tohoto podrodu jsou si morfologicky velice podobní a těžce rozlišitelní.



Obr. 4.1.3: Fylogenetický strom rodu *Sergentomyia* konstruovaný na základě sekvencí pro Cyt b bayesovskou metodou.

4.1.3 Pokusy s druhem *Sergentomyia schwetzi*

4.1.3.1 Vliv rozmnožování na morfologii dospělých samců

Během pokusů měl být sledován vliv typu rozmnožování flebotomů (autogenie, partenogeneze) na morfologii vnějších genitálií potomků, dospělých samců. U samic druhu *S. schwetzi* však nebyla prokázána ani autogenie ani partenogeneze. Všechny samice, u nichž byla testována autogenie, uhynuly do 14 dní po přemístění do sádkou vylitého kelímku, aniž by se vykladly. Při druhém pokusu, studujícím možnou partenogenezi samic, se vylíhlo jen 28 kukel z 50 izolovaných, a pouze v 16 případech se jednalo o samice. Tyto uhynuly během jednoho týdne od vylíhnutí bez vykladení vajíček.

4.1.3.2 Vliv teploty během larválního vývoje na morfologii dospělých samců

Všichni samci, kteří se vylíhli po vývoji v rozdílných teplotách, byli po zalití do trvalého preparátu prohlédnuti, ale u žádného nebyla nalezena atypická morfologie genitálií. Rozdíly byly jen v době trvání larválního vývoje a ve velikosti měřených částí těla dospělců.

Samci, kteří se vyvíjeli v teplotě 30 °C, prodělali bez problémů celý cyklus od vajíčka po dospělé v rozmezí 24 až 34 dnů, tedy asi o 10 dní rychleji než laboratorní kolonie držená v 25 °C. Naproti tomu larvy z vajíček nakladených do kelímků, které byly prvních 25 dnů v teplotě 20 °C, se vylíhly teprve 4 dny poté, co byly tyto kelímky přemístěny do teploty 25 °C. V této teplotě se larvy vyvíjely 1 týden do stádia larvy L2, pak byl jeden z těchto kelímků vrácen zpět do teploty 20 °C. Larvy, které se nadále vyvíjely v teplotě 25 °C, dokončily svůj vývoj za 30 až 55 dní od vylíhnutí larev L1, ale dospělci z kelímku přemístěného zpět do 20 °C začali vyletovat nejdříve 65 dní po vylíhnutí larev L1. Doby vývoje larev jsou shrnuty v tabulkách 4.1.9 a 4.1.10.

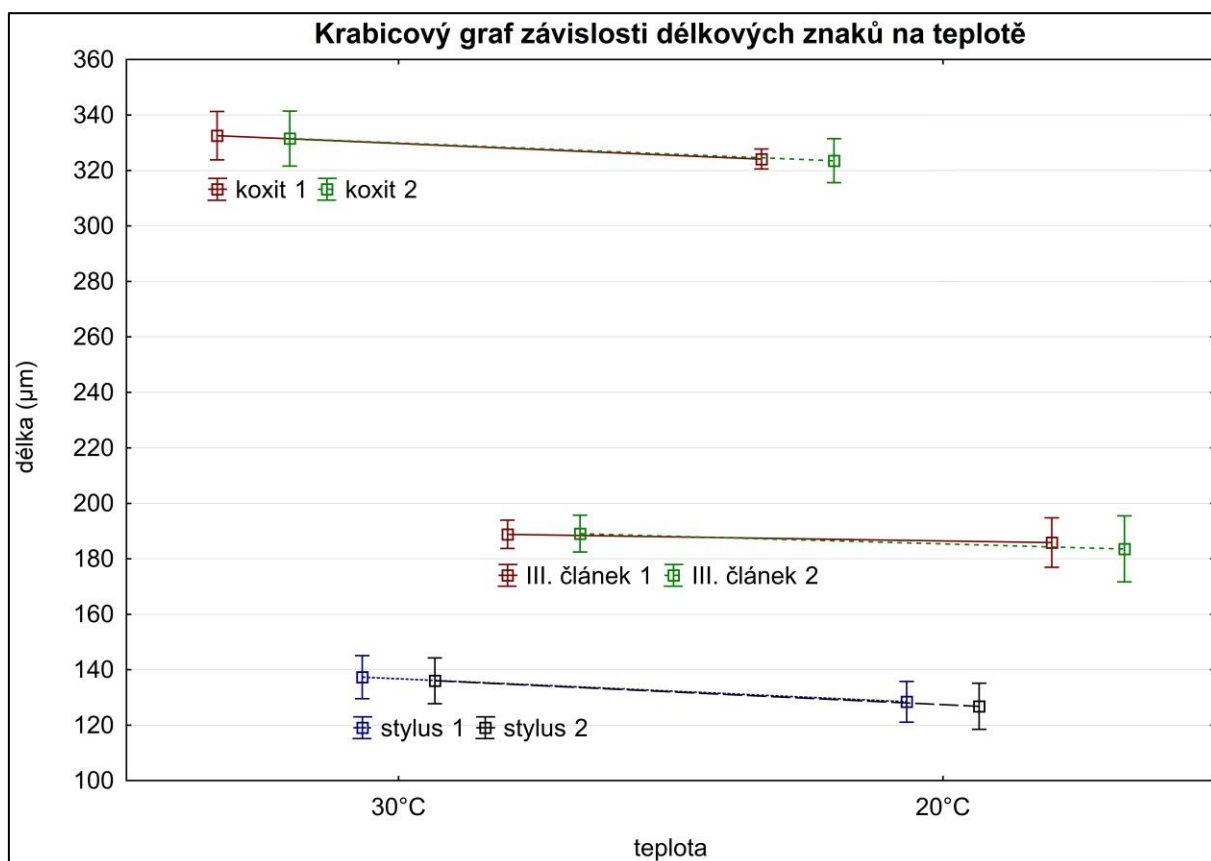
Velikostní rozdíly v délce III. antenálního článku, koxitu a stylu jsou zobrazeny v grafu na obrázku 4.1.4. Větší byli samci, kteří se po celou dobu vyvíjeli v teplotě 30 °C a ti chovaní v teplotě 25 °C se od nich velikostně nelišili a tudíž tato skupina nebyla zahrnuta do statistického vyhodnocení t-testem.

Tab. 4.1.8: Doba vývoje jednotlivých stádií *S. schwetzi* při teplotě 30 °C.

vajíčka	larvy L1	larvy L2	larvy L4	kukly	dospělci
7 dní	5 dní	3 dny	4 dní	5 dní	10 dní

Tab. 4.1.9: Doba vývoje jednotlivých stádií *S. schwetzi* při teplotách 20 °C a 25 °C.

vajíčka		larvy L1	larvy L2		larvy L4	kukly	dospělci
20 °C	25 °C			20 °C			
25 dní	4 dny	6 dní	5 dní	23 dní	24 dní	7 dní	14 dní
20 °C	25 °C						
25 dní	4 dny	6 dní	14 dní		5 dní	5 dní	25 dní



Obr. 4.1.4: Závislost velikosti III. antenálního článku, koxitu a stylu na teplotě během larválního vývoje samců *S. schwetzi* (t-test).

5.1 Diskuze

Zástupci rodu *Sergentomyia* byli dlouhou dobu přehlíženi, jelikož byli považováni pouze za nedůležitou sesterskou skupinu rodu *Phlebotomus*, která přenáší parazity plazů a obojživelníků, ale nijak se nepodílí na šíření savčích patogenů. Toto paradigma tak předpokládalo, že druhy rodu *Phlebotomus* sají na savcích, zatímco zástupci rodu *Sergentomyia* na plazech a obojživelnících; existuje však řada výjimek a často záleží spíše na lokalitě, sezóně a dostupnosti hostitelů (Lewis 1974). Postupně navíc přibývaly důkazy, že druhy rodu *Sergentomyia* sají též na savcích a posléze i nálezy savčích leishmanií v jejich trávicím traktu.

Sání na savcích včetně člověka bylo jednak pozorováno, ale následně i mikroskopicky či pomocí PCR prokázáno (např. Quate 1964, Berdjane-Brouk *et al.* 2012). Spolu s tím byly druhy rodu *Sergentomyia* vyšetřovány na přítomnost savčích leishmanií a začalo být diskutováno jejich případně zapojení do přenosu onemocnění. Zástupci rodu *Leishmania* byli prokázáni buď pomocí mikroskopie (Kaddu *et* Mutinga 1984), kultivace a biochemické charakterizace (Mutinga, Kyai *et* Omogo 1986, Mutinga *et al.* 1994) či později s využitím PCR (Parvizi *et* Amirkhani 2008, Nzelu *et al.* 2014). U většiny druhů, v nichž byly nalezeny savčí leishmanie, se tak předpokládalo, že by mohly být zapojeny do jejich přenosu, jelikož se v hojných počtech vyskytovaly v ohniscích nemoci a vektor infekce byl neznámý. V některých studiích byla postulována možnost zapojení druhů rodu *Sergentomyia* do přenosu savčích leishmanií jen na základě jejich mnohonásobně vyšší četnosti oproti druhům rodu *Phlebotomus* v endemických ohniscích leishmaniózy (Senghor *et al.* 2011).

Nicméně dodnes neexistuje žádný důkaz o možnosti přenosu zástupců rodu *Leishmania* druhy rodu *Sergentomyia*. Naopak některé studie přinášejí důkazy, že zkoumané druhy leishmanií se nemohou v testovaných druzích rodu *Sergentomyia* vyvíjet. Problém je v tom, že leishmanie nepřekonají peritrofickou matrix a jsou spolu s ní a nestrávenými zbytky potravy defekovány, jelikož rod *Sergentomyia* se od rodu *Phlebotomus* liší fyziologií trávení a jeho peritrofická matrix se rozpadá až při defekaci (Shatova, Safjanova *et* Ovezmukhammedov 1991). Experimentální infekce jsou navíc slabé, parazité se nevyvíjejí a postupně umírají (Lawyer 1990). V minulém roce tak byla experimentálně vyvrácena možnost přenosu tří druhů leishmanií infikujících člověka (*Leishmania donovani*, *L. infantum* a *L. major*) prostřednictvím hojného afrického druhu *S. schwetzi*, který byl v minulosti jako potenciální vektor často zmiňován. Jeho zapojení do přenosu není možné právě ze zmíněných důvodů dynamiky a fyziologie trávení krve (Sadlova *et al.* 2013). Určitou naději k nalezení

alternativního přenašeče druhů rodu *Leishmania* dává studie, kde byli jako potenciální vektorů v Austrálii označeni tiplici rodu *Lasiohelea*, u nichž byly pitvou prokázány silně rozvinuté infekce, experimentální průkaz přenosu však dosud proveden nebyl (Dougall *et al.* 2011).

Rod *Sergentomyia* je však i mimo přenos leishmanií pro člověka důležitý, jelikož jeho zástupci by mohli být zapojeni do přenosu různých arbovirů (např. Geevarghese *et al.* 2005, Charrel *et al.* 2006).

V posledních letech zájem o tento rod opět roste, jelikož se stále více ukazuje, že jeho taxonomie není ani zdaleka dořešena a více se též zvažuje jeho význam v přenosu lidských infekčních onemocnění, vzhledem k časté přítomnosti jeho zástupců v endemických oblastech. Nicméně předešlé opomíjení této skupiny dokazuje fakt, že poslední shrnutí taxonomie celého rodu je staré už 20 let (Seccombe, Ready *et* Huddleston 1993) a opírá se klasifikaci morfologických znaků. Přehled etiopské fauny je pak ještě starší a celkem je v něm popsáno 94 druhů rodu *Sergentomyia* (Abonnenc 1972), z nichž některé byly později synonymizovány či přesunuty do jiných podrodů.

Dle morfologie byly identifikovány čtyři druhy a dva komplexy morfologicky velice podobných druhů. Určování byli pouze samci, jelikož u samic nebyly viditelné spermatéky, které jsou základním rozlišovacím znakem. U samců je tímto znakem morfologie vnějších genitálií, především pak postavení trnů na stylu a tvar aedeagu (viz fotografie v kapitole 3.1 Materiál a metodika, str. 33). Většina zástupců rodu *Sergentomyia* v našich sběrech, s výjimkou podrodu *Parvidens* (zastoupen byl pouze druhem *S. lesleyae*), má jen čtyři trny na stylu. Umístění těchto trnů jasně vylučuje druh *S. schwetzi*, který má na rozdíl od zbylých druhů z odchytů trny odděleny do dvou samostatných skupin. To ovšem neplatí pro jeho atypické formy, ty mají všechny čtyři trny na konci stylu. To poměrně znesnadňuje jejich určení, jelikož se velmi podobají zástupcům komplexu *antennata* podrodu *Sergentomyia*. Jednotlivé druhy tohoto rodu se odlišují na základě počtu, postavení a velikosti zubů v cibáriu a délkových znaků jak genitálií (koxit, paramera, stylus a surstylus), tak hlavy (palpální a antenální články či askoidy). Délkové znaky však mohou být výrazně ovlivněny jednak skladováním vzorku, ale také jeho zamontováním do trvalého preparátu. Provedení takového preparátu navíc ovlivňuje i viditelnost vnitřních znaků, cibária a farynxu, ale právě dle morfologie zubů se velmi často definují jednotlivé druhy. Příkladem z našich sběrů může být odlišení *S. adleri* a *S. clydei*. Určení druhu *S. clydei* je obtížnější také pro jeho vysokou vnitrodruhovou variabilitu; počet zubů v cibáriu je nestabilní, jsou špatně viditelné a šestý abdominální tergít může být zvětšený. Tato různorodost navíc nijak nekoresponduje s jednotlivými populacemi, ani není podmíněna geografickým původem jedinců, jak bylo

potvrzeno analýzou sekvencí Cyt b. Takto pozorovaná vnitrodruhová variabilita je nejspíše částečně důsledkem morfologických změn po zalití jedince do trvalého preparátu (Depaquit *et al.* 2013). Velikost šestého abdominálního tergitu variuje též u atypické formy druhu *S. schwetzi* (Abonnenc 1959). Tato atypická forma byla později Lewisem označena jako Rangu forma a zároveň byla popsána další Amudat forma, která nemá zvětšený šestý tergít a od ostatních druhů skupiny antennata se odlišuje tvarem cibária a zuby (Lewis, Barnley *et al.* 1969). V našich sběrech jsem identifikovala mnoho zástupců druhu *S. schwetzi*, většinou se jednalo formu typickou a u několika vzorků by mohlo jít o formu Amudat.

Několik zástupců bylo také určeno jako *S. antennata*, ale většina vzorků byla zařazena pouze do komplexu antennata, vzhledem k variabilitě či chybění jejich morfologických znaků. Chybějící morfologické znaky jsou zpravidla umístěny na anténách a palpách, jelikož ty jsou často při manipulaci s flebotomy poškozeny či ztraceny. Zástupci tohoto komplexu byli opětovně morfologicky identifikováni po sekvenační analýze.

Problematické bylo též určování druhů komplexu africana podrodu *Parrotomyia*. Jednotlivé druhy jsou si velmi podobné a liší se především znaky na hrudi, případně cibariálními zuby či délkou palpáních segmentů. Znaky na hrudi jsou pro nás ale nedostupné, jelikož tato část těla flebotoma se používá k izolaci DNA. Druhy jsem určila pouze jako zástupce komplexu africana a k rozdělení do druhu došlo až po sekvenační analýze.

Právě z důvodů nejednoznačnosti a nedostatečnosti morfologického určování se začaly využívat k identifikaci molekulární metody. Od představení DNA-barcodingu v roce 2003, Hebert *et al.*, bylo pomocí této metody identifikováno mnoho skupin organismů, včetně hmyzu. Pro správnou identifikaci druhů je zde nutné spolehlivě oddělit vnitrodruhovou variabilitu sekvencí od té mezidruhové. Pro velkou informativnost svého sekvenčního úseku byl pro analýzy vybrán gen pro COI, jehož předností je i možnost použití univerzálních primerů (Hebert *et al.* 2003), ovšem na úkor rozlišení blízce příbuzných druhů a druhů, u nichž právě probíhá hybridizace, a mitochondriální linie tedy ještě nebyly spolehlivě odděleny. Pro tyto jedince je pak potřeba rozšířit analýzu buďto o sekvence jaderných úseků, např. ITS (Manonmani *et al.* 2001), nebo případně použít evolučně rychlejší část mitochondriálního genomu, jako je gen pro ND4 (Depaquit *et al.* 2005). Právě hybridizace mezi blízkými druhy je velkou slabinou této metody, jelikož se jedná o jev u hmyzu poměrně běžný a známý též u podčeledi Phlebotominae (Pesson *et al.* 2004).

Rutinní určování flebotomů se sice stále ještě opírá o morfologické znaky, ale DNA-barcoding už byl na jejich identifikaci úspěšně aplikován: na novovětské druhy v Kolumbii

(Gutierrez *et al.* 2014), na starosvětské zástupce v Indii (Kumar, Srinivasan *et al.* Jambulingam 2012) či Afganistánu, kde byl však místo genu COI použit Cyt b (Krueger *et al.* 2011).

My jsme flebotomy analyzovali na základě obou genů, COI i Cyt b. Pro sekvence genu COI jsme použili několik párů primerů, jelikož zpočátku jsme se potýkali se značnými problémy s amplifikací daného úseku. Prvními páry primerů byly Lep F a Lep R (Hajibabaei *et al.* 2006) a primery LCO 1490 a HCO 2198 uvedené jako vhodné univerzální primery (Hebert *et al.* 2003). Vzhledem k tomu, že amplifikace pomocí těchto primerů byla poměrně sporadická, navrhli jsme si podle získané sekvence *S. schwetzi* primery vlastní, SM_SW, s nimiž se nám povedlo získat další sekvence. Posléze jsme podle publikovaných dat upravili amplifikační program pro primery LCO 1490 a HCO 2198 (Kumar, Srinivasan *et al.* Jambulingam 2012) a po této úpravě se nám podařilo získat nové sekvence. V rámci optimalizace amplifikační reakce jsme vyměnili také Master Mix (Top Bio s.r.o.) za nový (Takara Bio), který se ukázal jako mnohem účinnější a spolu s primery Lep se nám v této kombinaci zdařilo amplifikovat nejvíce vzorků. Ostatní uvedené primery pro COI byly vyzkoušeny v rámci hledání vhodného řešení daných problémů. U sekvencí genu pro Cyt b jsme řešili obdobné problémy, ale žádné jiné vyzkoušené primery se neukázaly být lepší, než první zvolený pár CB3-PDR a NIN-PDR (Ready *et al.* 1997).

Kromě COI a Cyt b jsme též amplifikovali sekvence genů pro EF-1 α , ITS2 a SSU. V případě amplifikace genu pro EF-1 α byla koncentrace DNA v získaném PCR produktu tak nízká, že dané vzorky nebyly sekvenovány. Naopak v PCR produktu ITS2 byla koncentrace DNA vysoká, ovšem sekvenace se ani po několika opakováních nepodařila, a to přestože jiné vzorky (rod *Phlebotomus*) byly bez problémů sekvenovány. Vizuální kontrola chromatogramu navíc ukazovala na pravděpodobně dvojité čtení úseku. Stejný problém je diskutován ve studii o systematice druhu *S. clydei*, kde autoři uvádějí jako důvod patrně nehomogenní kopie úseku (Depaquit *et al.* 2013). Různé alely najdeme v některých zástupcích nejspíše i v případě genu pro EF-1 α . Jeho sekvence byly sice použity jako molekulární marker pro flebotomy z Iránu, ale jestliže se vyskytují ve více kopiích, výsledek není věrohodný (Parvizi *et al.* Assmar 2007).

Sekvencí pro SSU se nám bohužel podařilo získat jen pět, jelikož u ostatních vzorků docházelo k amplifikaci hub a kvasinek. Z tohoto důvodu jsme univerzální primery Medlin A a B vyměnili za nový pár F1 a R1 (Aransay *et al.* 2000), jimiž amplifikované sekvence byly použity pro analýzu vztahů uvnitř podčeledi Phlebotominae, ovšem výsledek byl stejně neuspokojivý.

Jako outgroup měla být původně u obou analýz použita skupina *Psychoda*, ale v analýze Cyt b se tento rod nepodařilo definovat jako outgroup a místo ní byl použit rod *Lutzomyia*. Na fylogenetickém stromě podle COI je pak rod *Lutzomyia* blíže rodu *Phlebotomus* než *Sergentomyia*, což je v rozporu se studií o příbuznosti těchto rodů provedenou na základě sekvencí D2 domény 28S rDNA, kde vyšel rod *Lutzomyia* jako bližší rodu *Sergentomyia* (Depaquit *et al.* 1998).

Rod *Sergentomyia* se podle obou analýz, COI i Cyt b, zdá být parafyletický, jelikož jeho podrod *Parvidens* se v obou případech přidružil k rodu *Phlebotomus*. V případě analýzy podle COI zaujal postavení sesterského rodu, u analýzy Cyt b pak podrodu rodu *Phlebotomus*. Ke stejnému závěru dospěla studie založená na numerické taxonomii, i zde se rod *Sergentomyia* jevil jako parafyletický a postavení podrodu *Parvidens* bylo nejisté (Rispalet *et Leger* 1998). Zástupci tohoto podrodu byli dříve řazeni do podrodu *Euphlebotomus*, ale v roce 1964 byly přesunuty do samostatného podrodu rodu *Sergentomyia* (Theodor *et Mesghali* 1964). Různí autoři však tuto skupinu považovali za samostatný rod (Artemiev *et Neronov* 1984) příbuzný dokonce spíše novosvětským zástupcům (Abonnenc *et Leger* 1976) a i dnes jej někteří autoři (Depaquit) uvádějí na úrovni rodu. K zjištění skutečného postavení této skupiny by bylo potřeba provést analýzu více genů.

Jako parafyletické se zároveň jeví i jednotlivé podrody rodu *Sergentomyia*. Všichni zástupci sice v obou případech klastují pouze se zástupci stejného druhu, avšak druhy se nesdružují do svých podrodů. Navíc příbuznost jednotlivých rodů se liší mezi oběma analýzami.

Podrod *Sergentomyia* byl již dříve označen jako nedostatečně dobře definovaný, jelikož od svého počátku zahrnoval všechny druhy rodu *Sergentomyia*, které byly rozděleny do jednotlivých skupin, z nichž některé byly posléze povýšeny na podrody. Jako parafyletický byl tento podrod označen i ve fylogenetické studii na základě sekvencí Cyt b, kde druhy *S. sintoni* a *S. minuta* nesdílely společnou větev (Krueger *et al.* 2011). V naší analýze (Cyt b) jsou sice tyto dva druhy pospolu s většinou zástupců podrodu *Sergentomyia*, ale zbylý druh *S. schwetzi* sdílí společnou větev s částí podrodu *Parrotomyia*. Dle druhé analýzy (COI) je podrod *Sergentomyia* též parafyletický, ale druh *S. schwetzi* je tentokrát blízký druhu *S. clydei*, a *S. minuta* spolu s *S. punjabensis* jsou na větvi společně s částí podrodu *Parrotomyia*; *S. sintoni* zde není. Na fylogramu dle COI je navíc podrod *Sergentomyia* roztržštěn do mnoha skupin oproti fylogramu Cyt b, pouze zástupci komplexu antennata jsou si blízcí v obou případech. U analýzy COI se mimo jiné v rámci druhu *S. antennata* z etiopských vzorků vyčlenila jedna skupina, pravděpodobně se jedná o populaci, jejíž

sekvence je změněna indelem. Zároveň se od našich vzorků též odčlenila skupina sekvencí z jedinců chycených v Alžírsku; žádná skupina se však nevyčlenila na fylogramu Cyt b. Parafyletické postavení zástupců tohoto podrodu naznačuje, že možná i další jeho druhy by se mohly časem stát zástupci vlastních podrodů.

Zástupci podrodu *Parrotomyia* nebyli určeni do druhu, ale podle sekvencí se rozdělili do dvou skupin, z nichž jedna byla pomocí sekvence Cyt b stažené z GenBanku určena jako *S. magna* a druhá byla poté identifikována jako *S. eremitis*, vzhledem k tomu, že sekvence COI druhu *S. africana africana* tvořila sesterskou skupinu těmto dvěma. Tyto tři druhy jsou si morfologicky velice podobné a vzhledem k povaze diagnostických znaků je těžké je spolehlivě odlišit. Tento podrod vyšel v obou analýzách též jako parafyletický, přičemž jeho zástupci se sdružují se zástupci podrodu *Sergentomyia*. Podrod *Parrotomyia* by definován Theodorem v roce 1958, ale do té doby byli jeho zástupci sdruženi v rámci skupiny *africana* právě podrodu *Sergentomyia* a do tohoto podrodu je ještě v roce 1972 zahrnul i Abonnenc.

Nedávno se také ukázalo, že druh *S. bailyi* je komplexem alespoň dvou kryptických druhů (na obrázku 4.2 je pouze jeden druh), které byly odlišeny pomocí DNA-barcodingu, na základě sekvencí pro COI. Ve stejné studii byli také pomocí sekvencí COI odlišeny dva druhy *S. babu babu* a *S. babu insularis*, které bylo morfologicky možné určit pouze podle samic. Tyto sekvenční rozdíly vedly k navržení nových druhů *S. babu* a *S. insularis*, ale jejich taxonomické postavení je třeba aktualizovat (Kumar, Srinivasan *et al.* Jambulingam 2012).

Posledním podrodem v našich sběrech je podrod *Sintonius*, Nitzulescu 1931, který byl jedním z prvních popsáných, jelikož sdružuje zástupce s poměrně homogenními morfologickými znaky, přesto jsou tyto zástupce sekvenčně velice odlišní. Na fylogramu COI tvoří tři zahrnuté druhy tři různé skupiny spolu s druhy podrodu *Sergentomyia* a *Spelaemyia*. Naproti tomu analýza Cyt b sdružuje tento podrod v rámci jedné větve, avšak na její bázi se odštěpují ještě zástupci podrodu *Grassomyia*.

Jako parafyletický potvrdila tento podrod i nová studie provedená na genu pro Cyt b a D1-D2 a D8 doménách rDNA. Navíc druhy, které neklastrovaly se zbytkem podrodu, z nichž jeden je nově popsáný a druhý má nově opravený popis, byly navrženy do vlastního podrodu *Trouilletomyia* (Randrianambinintsoa *et al.* 2014).

Nejhojněji zastoupeným druhem tohoto podrodu byla *S. clydei*, která je morfologicky velice variabilní, ale sekvenčně poměrně homogenní. Na fylogramu COI se výrazněji oddělují pouze sekvence stažené z GenBanku jedinců z Alžírsko, ale na stromě podle Cyt b se druh rozdělil na dvě skupiny. První z nich zahrnuje sekvence z GenBanku a jednoho zástupce z jihu Etiopie, druhá pak sdružuje též etiopské sekvence, ty ovšem byly získány dříve jinými

členy naší laboratoře. V poslední systematické studii tohoto druhu byla zmíněna možnost, že by se mohlo jednat komplex kryptických druhů. Důvodem je vysoká sekvenční homogenita mezi jedinci z afrického kontinentu a Středního východu, jimž je ale populace *S. clydei* ze Seychelských ostrovů sekvenčně poměrně vzdálená. Sekvenační analýzy byly provedeny na genech Cyt b a cacophony, přičemž na obou se zmíněná populace vyčlenila, ale morfologicky se nijak neodlišuje od kontinentálních zástupců (Depaquit *et al.* 2013).

Zatímco sekvenční odlišení morfologicky identických jedinců vede k popisu kryptických druhů, sekvenční podobnost morfologicky rozdílných zástupců je většinou důsledkem právě probíhající hybridizace, případně nedokonalého oddělení mitochondriálních linií. Sekvenčně nerozlišitelné druhy najdeme například mezi zástupci rodu *Culicoides* (Ander, Troell *et* Chirico 2013) či mezi druhy rodu *Aedes* (Cywinska, Hunter *et* Hebert 2006). Je však otázkou, jestli i tento fenomén může mít vliv na sekvenční podobnost druhu *S. schwetzi* a šesti jedinců, kteří by morfologií mohli odpovídat popisu *S. schwetzi* forma Amudat.

Jak již bylo řečeno, u druhu *S. schwetzi* byly popsány tři různé morfologické formy. Tyto formy byly ovšem rozpoznány pouze u samců, zatímco u samic takové rozdíly nalezeny nebyly. Není tedy jasné, zda se jedná o tři různé druhy s kryptickými či morfologicky si velice podobnými samicemi, nebo se jedná o jeden druh, kdy morfologie samců je značně variabilní.

Skutečnost, že samice několika druhů jsou morfologicky (téměř) identické a jejich druhové zařazení je možné pouze podle preparátů samců, kteří byli chyceni ve stejné oblasti, je známo například u podrodu *Helcocyrtomyia* rodu *Lutzomyia* (Cazorla 2009) nebo u samic některých druhů podrodu *Paraphlebotomus* rodu *Phlebotomus* (Depaquit, Leger *et* Killick-Kendrick 1998), ale kryptické samice najdeme též třeba u zástupců rodu *Aedes* (Brust *et* Mahon 1997). Navíc samotní autoři, kteří dané formy samců popsali, připouští, že by se mohlo jednat o poddruhy či různé druhy. Tato varianta by byla podpořena skutečností, že samice dříve popsaná jako *S. schwetzi* var. *nigricans*, později synonymizovaná se *S. schwetzi*, pravděpodobně náleží k atypickému samci popsanému jako forma Amudat (Lewis, Barnley *et* Minter 1969). Tato samice byla navíc o tři roky později uvedena jako poddruh *S. schwetzi* (Abonnenc 1972) a též u ní bylo pozorováno, že saje ochotněji na lidech oproti samicím asociovaným se samci typické formy *S. schwetzi* (Minter 1963). Naproti tomu samice Rangu formy nejsou nijak odlišitelné od samic typické formy *S. schwetzi*, ale samci mají zvětšený šestý abdominální tergít. Variace ve velikosti tohoto tergítu je ale známá i u jiných druhů, například *S. clydei* (Depaquit *et al.* 2014). Tato atypická forma se vyskytuje především v západní Africe a obvykle sympatricky s formou typickou (Lewis, Barnley *et* Minter 1969);

v našich sběrech nebyl nalezen žádný její exemplář. Druh *S. schwetzi* by tedy mohl být komplexem dvou (pod)druhů, kde *S. schwetzi* typická a Rangu forma spadají do jednoho, zatímco forma Amudat tvoří druhý.

Druhou možností je, že se jedná o jeden druh, jehož samci se liší morfologií svých genitálií. Tato situace by mohla být podpořena výsledkem, že dva samci určení dle morfologie jako příslušníci skupiny antennata, kterým jsou atypičtí samci (forma Amudat) *S. schwetzi* velice podobní, se svou sekvencí Cyt b shodují s druhem *S. schwetzi*. Stejně tak čtyři jiní samci ze skupiny antennata mají shodnou sekvenci COI se samci *S. schwetzi*. Celkem bylo tedy identifikováno šest sekvenčně shodných jedinců s druhem *S. schwetzi*. Ovšem shoda v sekvenci jednoho genu není dostatečným potvrzením, že se jedná o stejný druh, jelikož může jít o chybu ve čtení či kontaminaci. U daných jedinců se také zatím nepodařilo amplifikovat další gen a morfologické odlišení zástupců formy Amudat se opírá pouze o morfologii cibária.

Typická a atypická Amudat forma se mimo jiné liší i svou četností během roku. Typická forma se vyskytuje především během období sucha a forma Amudat zase více během období dešťů (Wijers *et* Minter 1962, Minter 1964). Vzhledem k tomu, že morfologie dospělců může být ovlivněna vnějšími faktory působícími během larválního vývoje, vystavili jsme larvy *S. schwetzi* dvěma extrémním teplotám. Za předpokladu, že by obě formy (typická i atypická) samců náleželi k jednomu druhu, pak právě teplota, která se mezi obdobími dešťů a sucha liší, by mohla mít vliv na vzhled samců. Nižší teplota, v našem případě 20 °C, simulovala teplotu v půdě na počátku období sucha, kdy dosahuje průměrně asi 23 °C, a teplota 30 °C pak odpovídala období dešťů, kdy je průměrná teplota v půdě přibližně 28 °C. Ovšem 30 °C dosahuje teplota v půdě postupně i během suchého období. Tyto teploty byly naměřeny 45 cm hluboko v prasklinách vertisolu, v případě, že by tyto praskliny byly stíněny vegetací, pak by byly teplotní rozdíly mezi sezónami nižší (Moncaz *et al.* 2014). Avšak žádný vliv na morfologii genitálií dospělých samců nebyl zjištěn a dospělci se lišili pouze délkou svého vývoje, která byla logicky delší u larev chovaných v nižší teplotě, a svou velikostí. Jedinci chovaní v nižší teplotě byli menší velikosti, přestože se vyvíjeli déle, ovšem teplota 20 °C je pro flebotomy hraniční, jelikož je to minimální teplota, při které mohou dokončit vývoj (Perfilijev 1968). Zdá se ale, že tato teplota ovlivňuje především líhnutí larev z vajíček, jelikož skutečná teplota, která byla naměřena v písku, kde byl umístěn kelímek s vajíčky, byla přibližně 18,5 °C, pravděpodobně kvůli vysoké vlhkosti. Larvy z vajíček se pak začaly líhnout až po přemístění kelímku do vyšší teploty. Larvy L2, které byly opět vráceny do nízké teploty, však zvládly vývoj až do stádia kukly, a 10 samců a 5 samic se dokonce vylíhlo.

Všichni samci, kteří vylétli, měli genitálie typické morfologie *S. schwetzi* a lišili se pouze velikostí těla. Ta byla zjištěna měřením koxitu, stylu a III. antenálního článku, jelikož křídla jsem neměla k dispozici. Opačný efekt zaznamenali ve studii o *Aedes polynesiensis*, kde samci s nejdelšími křídly byli ti, kteří se vyvíjeli v teplotě 20 °C a nejmenší jedinci se vylíhli v teplotě 30 °C (Hapairai *et al.* 2013). Pro komáry ovšem teplota 20 °C není hraniční teplotou. U komárů byl též zjištěn drobný vliv teploty během vývoje na morfologii dospělců, konkrétně na tvar jejich křídel (Aytekin, Aytekin *et al.* 2011).

Vedle vlivu různých teplot jsme též testovali, zda morfologii dospělých samců nemůže ovlivnit případná autogenie či partenogeneze jejich matek. Autogenie je jev, kdy pro vykladení první snůšky nemusí samice krev sajícího hmyzu nasát krev a pro vytvoření prvních vajíček jí stačí živiny naakumulované během larválního vývoje. Přestože je autogenie známa u několika druhů podčeledi Phlebotominae, například *P. papatasi* (El-Kammah 1973) či některé druhy rodu *Lutzomyia* (Felingiaceli 1993), samice *S. schwetzi* autogenní nejsou.

Zatímco autogenie je jev poměrně běžný, tak partenogeneze je zatím známa pouze u dvou zástupců podčeledi Phlebotominae, a to navíc novosvětských jeskynních druhů: *Lutzomyia (Pintomyia) mamedei* (Brazil *et al.* 1999) a *L. (Deanemyia) maruaga* (Alves *et al.* 2011). Další partenogenetické druhy bychom našli v sesterské podčeledi Psychodinae (Duckhouse 1985 cit. dle Brazil *et al.* 1999). Vzhledem ke speciálním podmínkám, jimž jsou vystaveny jeskynní druhy, není zarážející, že druh *S. schwetzi* partenogenetický není.

ČÁST 2
IDENTIFIKACE DRUHŮ PODČELEDI PHLEBOTOMINAE
POMOCÍ MALDI-TOF MS

3.2 Materiál a metodika

3.2.1 Chov flebotomů

K prvním měřením byli použiti flebotomové z našich laboratorních chovů (v závorce je uveden původ kolonie); druhy *Phlebotomus (Adlerius) arabicus* (Izrael), *P. (Euphlebotomus) argentipes* (Indie), *P. (Larroussius) perniciosus* (Španělsko), *P. (Larroussius) tobbi* (Turecko), *P. (Paraphlebotomus) sergenti* (Izrael, Turecko), *P. (Phlebotomus) papatasi* (Turecko), později pak byly zahrnuty i další druhy z kolonií: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Brazílie), *Phlebotomus (Larroussius) orientalis* (Etiopie), *P. (Phlebotomus) duboscqi* (Senegal), *Sergentomyia (Sergentomyia) schwetzi* (Etiopie). Chovy flebotomů byly umístěny v místnosti se 70% vlhkostí vzduchu, teplotou 25 °C a fotoperiodou 14 hodin světla a 10 hodin tmy.

Samice flebotomů byly jednou týdně sáty na laboratorních myších uspaných pomocí anestetik a vložených do nylonových sítí. Týden po sání byly samice přemístěny pomocí exhaustoru do sádkou vylitých kelímků, aby se mohly vyklást. V larválním stádiu byli flebotomové krmeni fermentovanou sušenou směsí králíčích pelet a králíčího trusu a chováni v sádkou vylitých kelímcích uložených ve vlhkém písku. Vylétující flebotomové pak byli vypouštěni z kelímků do nylonových sítí, vždy po dobu jednoho týdne. Dospělci byli krmeni 50% roztokem přírodního hnědého cukru a destilované vody, a to jak před sáním, tak po sání (shrnuje Volf *et* Volfova 2011).

3.2.2 Sběry flebotomů a jejich skladování

Vzorky flebotomů zastupujících divoké populace pocházely z terénních sběrů, prováděných pracovníky Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonosis and Geographical Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Řecko. Flebotomové byli chytáni v květnu 2014 na lokalitách Fodele a Agia Roumeli na Krétě. Odchyty byly prováděny standardní metodou pomocí CDC světelných pastí, získané vzorky byly uchovávány v 70% etanolu při laboratorní teplotě po dobu nejvýše dvou týdnů.

Zahrnuty byly navíc dva druhy pocházející ze sběrů z Ázerbájdžánu z června 2013, které provedli členové naší laboratoře. Odchyty byly prováděny také pomocí CDC světelných pastí, ale získané vzorky byly uchovávány v 96% etanolu při teplotě 4 °C.

3.2.3 Příprava vzorků a matrice

Chemikálie

- 96% a 70% denaturovaný etanol
- 96% a 70% nedenaturovaný etanol (Lach-Ner, s.r.o.)
- destilovaná voda (Top-Bio, s.r.o.)
- 25% kyselina mravenčí (Merck, KGaA)
- 60% acetonitril (Merck, KGaA)
- 0,3% kyselina trifluoroctová (Sigma-Aldrich)
- kyselina sinapová (Sigma-Aldrich)

Zástupci tří druhů rodu *Phlebotomus* (*P. papatasi*, *P. perniciosus* a *P. tobbi*), se kterými byly prováděny počáteční metodické pokusy, byli zabiti a skladováni několika různými způsoby. Jednak šlo o usmrcení flebotoma v mikrozkuhavce mrazem -20 °C (tabulka 3.2.1), ale také o uložení jedinců do mikrozkuhovek s etanolem různé koncentrace, buď denaturovaným, nebo nedenaturovaným. V tomto etanolu pak byli flebotomové ponecháni různě dlouhou dobu, jak je uvedeno v tabulce 3.2.2.

Tab. 3.2.1: Flebotomové zabítí mrazem -20 °C.

druh	počet jedinců	doba skladování (dny)
<i>P. papatasi</i>	10 samic	1
<i>P. perniciosus</i>	10 samic	
<i>P. tobbi</i>	10 samic	

Tab. 3.2.2: Flebotomové skladování v denaturovaném/nedenaturovaném etanolu.

druh	nasycenost etanolu	počet jedinců		doba skladování (dny)	
		samci	samice		
<i>P. papatasi</i>	70%	5	5	10	31
	96%	5	5		
<i>P. perniciosus</i>	70%	5	5		
	96%	5	5		
<i>P. tobbi</i>	70%	5	5		
	96%	5	5		

Na základě následných měření bylo zjištěno, že nej kvalitnější proteinová spektra je možné získat ze vzorků, skladovaných v 70% nedenaturovaném etanolu (tabulka 3.2.3)

Tab. 3.2.3: Přehled flebotomů skladovaných po různě dlouhou dobu v 70% nedenaturovaném etanolu.

druh	počet jedinců		doba skladování (dny)					
	samci	samice						
<i>P. papatasi</i>	5	5	1	3	10	31	39	75
	5	5						
<i>P. perniciosus</i>	5	5						
	5	5						
<i>P. tobbi</i>	5	5						
	5	5						

Po vyjmutí flebotoma z mikrozkušavky s etanolem mu byla oddělena hlava a abdomen pomocí pinzety a pitvacích nástrojů (minucie upevněná ve špejli), zbylý thorax s křídly a nohama byl ponechán vyschnout při laboratorní teplotě a poté byl přemístěn do 1,5ml mikrozkušavky, kde byl homogenizován pomocí sterilních platových pístů v 10 µl homogenizačního roztoku. Během metodických pokusů byla vyzkoušena homogenizace ve vodě a v 25% kyselině mravenčí.

Nakonec byly smíchány 2 µl homogenizovaného vzorku spolu s 2 µl MALDI matrice a 1 µl této směsi byl dvakrát nanesen na MALDI destičku a přibližně 15 minut ponechán schnout při laboratorní teplotě, aby došlo k vytvoření tenké homogenní vrstvy krystalů. Jako MALDI matrice byla použita kyselina sinapová (30 mg/ml) rozpuštěná v 60% acetonitrilu/0,3% kyselině trifluoroctové.

3.2.4 Měření na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru, zpracování spekter a tvorba dendrogramů

Použité programy

- MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

Spektra byla získána na hmotnostním spektrometru Ultraflex III (Bruker Daltonics) s desorpcí a ionizací laserem za přítomnosti matrice MALDI-TOF MS, který byl externě kalibrován pomocí směsi proteinů Protein Calibration Standard I (Bruker Daltonics). Hmotnostní spektra byla měřena v lineárním módu v rozsahu 2 000 až 25 000 Da a každé spektrum odpovídalo akumulaci 1000 laserových střel, respektive 5×200 laserových střel na pěti různých místech jednoho vzorku na MALDI destičce. Získaná spektra byla nakonec exportována do programu MALDI Biotyper 3.1 pro další zpracování (normalizace, vyhlazení, výběr píků) a pro následné vyhodnocení podle shlukové analýzy. Do analýzy bylo zahrnuto maximálně

100 píků, které měly intenzitu alespoň 0,1 % nejintenzivnějšího píku a současně poměr signál/šum vyšší než 3.

MALDI-TOF hmotnostní spektra byla vyhodnocena hierarchickou shlukovou analýzou pomocí programu MALDI Biotyper. Dendrogramy byly vytvořeny s využitím metody průměrné vazby a vzdálenosti byly určeny korelačním algoritmem.

3.2.5 Konstrukce fylogenetických stromů

Dendrogramy podrodů *Larroussius* a *Phlebotomus* byly porovnány s jejich fylogramem. Tento fylogenetický strom byl zkonstruován na základě sekvencí genu pro COI pomocí bayesovské metody a jako outgroup byl použit rod *Psychoda*. Zahrnutí jedinci pocházejí z různých terénních sběrů členů naší laboratoře, kteří tyto sběry také zpracovali a vytvořili tyto fylogramy.

Podrobnosti o konstrukci fylogenetických stromů viz kapitola 3.1 Materiál a metodika první části této práce, str. 46.

4.2 Výsledky

Pokusy byly prováděny se zástupci druhů čeledi Phlebotominae z našich laboratorních kolonií, spadajícími do různých podrodů a několika zástupci z terénních sběrů z Kréty (viz kapitola 3.2 Materiál a metodika, str. 69). Do následné analýzy spekter však byl zahrnut pouze druh *P. (Larroussius) neglectus*, jelikož profily ostatních druhů nebyly dostatečně kvalitní, zřejmě díky nevhodnému způsobu skladování. Z odchytů v Ázerbájdžánu byly zahrnuty dva druhy: *P. sergenti* a *P. tobbi*.

Proteinové spektrum flebotomů bylo měřeno pouze z proteinů thoraxu s použitím MALDI matrice a všechna spektra byla měřena v rozsahu 2 000 až 25 000 Da.

Cílem prvních pokusů bylo především zjistit, zda je možné metodu MALDI-TOF MS použít pro identifikaci flebotomů, dále optimalizace přípravy vzorků a ovlivnění spekter různými faktory.

4.2.1 Uchovávání a homogenizace vzorků

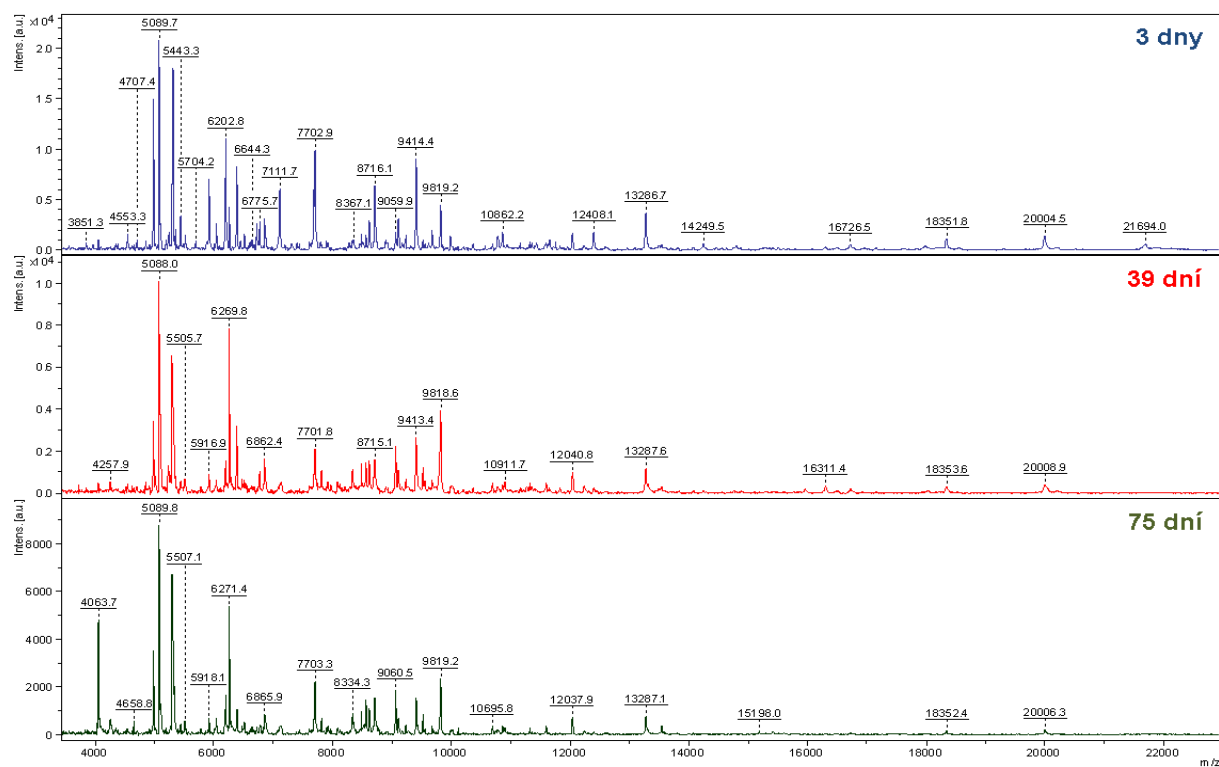
Jednotlivé vzorky flebotomů se lišily jednak tím, jak byli daní zástupci usmrceni, jak dlouho byli skladováni, ale také v čem byli následně homogenizováni. Tyto pokusy byly provedeny vždy s pěti samicemi tří různých druhů (*P. papatasi*, *P. perniciosus* a *P. tobbi*) a každý vzorek byl na MALDI destičku nanesen dvakrát. Celkem bylo v této sérii pokusů změřeno 195 různých zástupců rodu *Phlebotomus*.

V prvním z pokusů byly samice usmrceny buď 70% nebo 96% denaturovaným či nedenaturovaným etanolem a homogenizovány v 25% kyselině mravenčí. V případě použití denaturovaného etanolu ke skladování flebotomů jsme po homogenizaci získali velmi špatná spektra se zvýšenou základní linií a nízkou intenzitou píků. Rovněž při použití 96% nedenaturovaného etanolu spektra nebyla tak kvalitní jako v případě 70% nedenaturovaného etanolu a to především v malém množství píků. Pro další pokusy byli tedy zástupci skladováni výhradně v 70% nedenaturovaném etanolu.

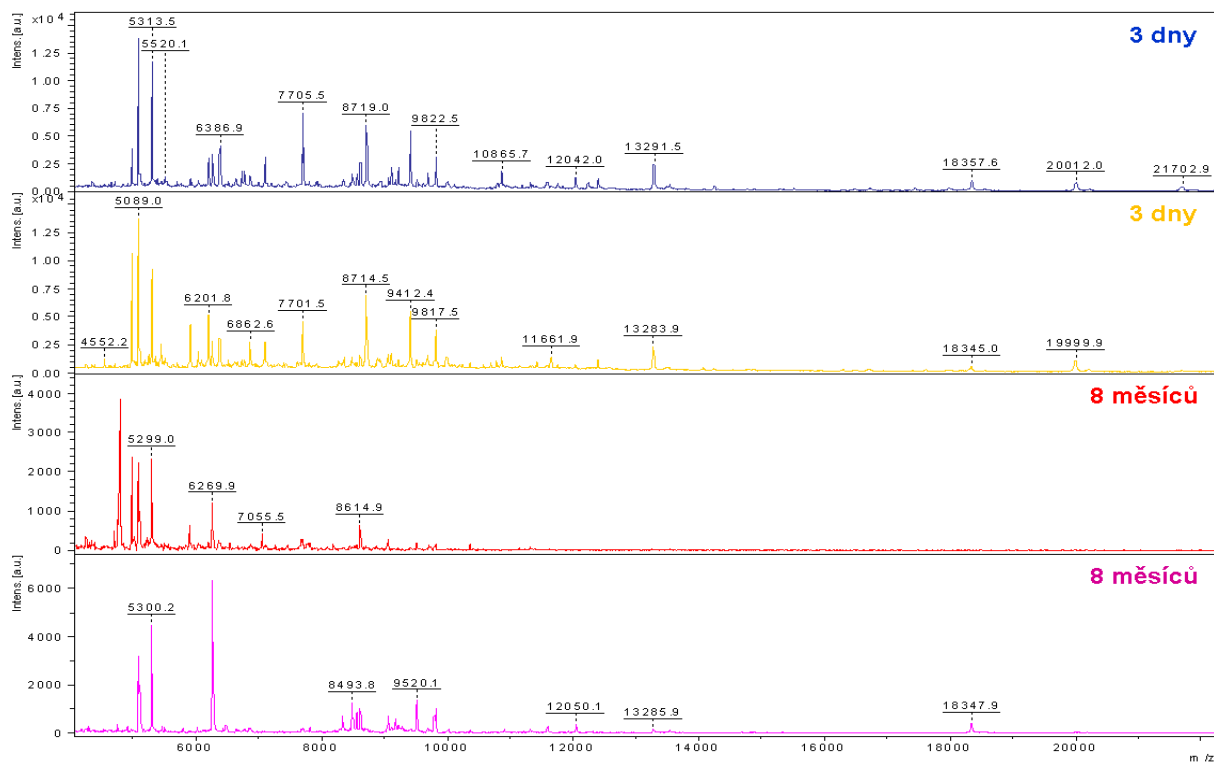
Důležitou otázkou také bylo, jak se proteinové spektrum bude proměňovat s délkou skladování flebotomů v 70% etanolu. Výsledky (pro *P. tobbi*) jsou na obrázku 4.2.1, z něhož vyplývá, že spektrum se v těchto časových obdobích příliš nezměnilo co do množství píků, avšak postupně došlo k poklesu intenzity celého spektra.

Proteinový profil *P. tobbi* byl porovnán ještě s 8 měsíci starými odchty tohoto druhu z Ázerbájdžánu, které však byly skladovány v 96% nedenaturovaném etanolu. V tomto případě došlo k výraznému poklesu intenzity celého spektra, vlivem čehož se méně intenzivní

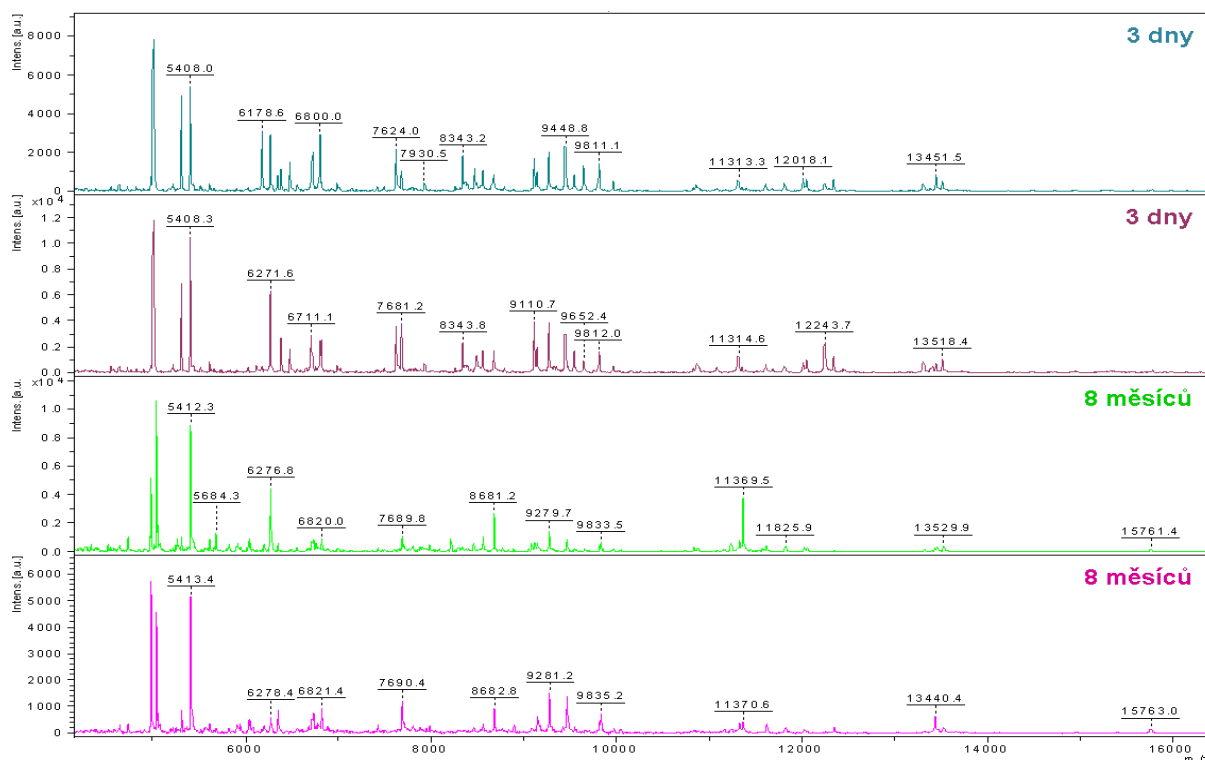
píky, především ve vyšších molekulových hmotnostech, ze spektra úplně vytratily. Ke stejnému srovnání došlo i u druhu *P. sergenti*, též s jedinci z odchytů v Ázerbájdžánu skladovanými 8 měsíců v 96% etanolu. Zde byl však pokles spektra zanedbatelný a píky byly i ve vyšších molekulových hmotnostech zachovány. Srovnání profilů 3 dny skladovaných jedinců v 70% etanolu a 8 měsíců skladovaných v 96% etanolu je na obrázku 4.2.2 (*P. tobbi*) a 4.2.3 (*P. sergenti*).



Obr. 4.2.1: Porovnání proteinových spekter flebotomů skladovaných různě dlouhou dobu v 70% etanolu (příklad *P. tobbi*).

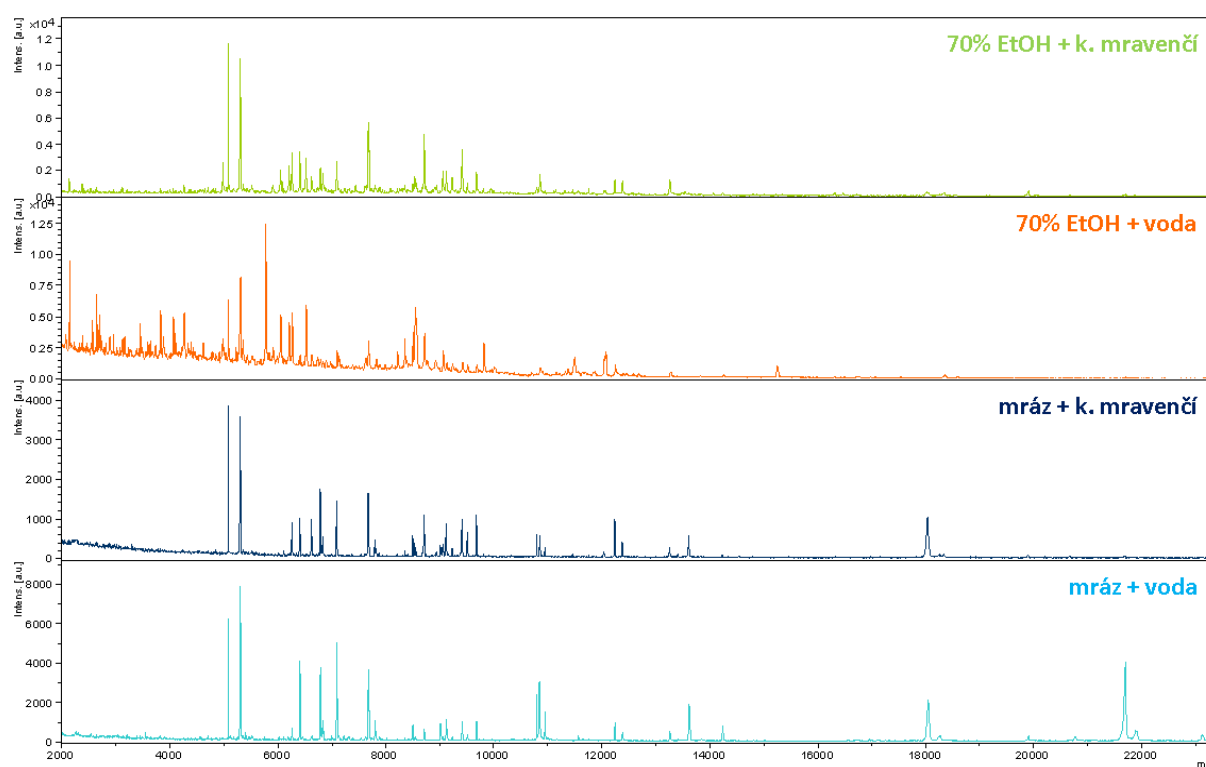


Obr. 4.2.2: Srovnání proteinových profilů dvou zástupců *P. tobbi*, skladovaných po 3 dny v 70% etanolu a dvou zástupců skladovaných 8 měsíců v 96% etanolu.



Obr. 4.2.3: Srovnání proteinových profilů dvou zástupců *P. sergenti*, skladovaných po 3 dny v 70% etanolu a dvou zástupců skladovaných 8 měsíců v 96% etanolu.

V dalším z pokusů byly samice jeden den před měřením usmrceny buďto mrazem $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo 70% nedenaturovaným etanolem a posléze homogenizovány jak ve vodě, tak v 25% kyselině mravenčí. Pokus byl proveden ve všech kombinacích a opakován vždy pro pět samic. Výsledná spektra (pro *P. perniciosus*) jsou na obrázku 4.2.4, z něhož je patrné, že nejlepší spektra dostaneme v kombinaci mráz a voda a to jak co do počtu proteinových píků, tak poměru signál/šum. Naopak velmi špatná spektra se zvýšeným šumem základní linie získáme v případě skladování vzorků v etanolu a jejich homogenizaci ve vodě. Málo intenzivní spektra byla zase výsledkem skladování flebotomů v mrazu a homogenizaci v kyselině mravenčí. Velice dobrá a intenzivní spektra dostaneme v kombinaci etanol a kyselina mravenčí, navíc tato spektra se při opakovaných měřeních ukázala v rámci druhu jako nejvíce stabilní a reprodukovatelná. Dále byli proto flebotomové skladováni v 70% nedenaturovaném etanolu a homogenizováni v 25% kyselině mravenčí.

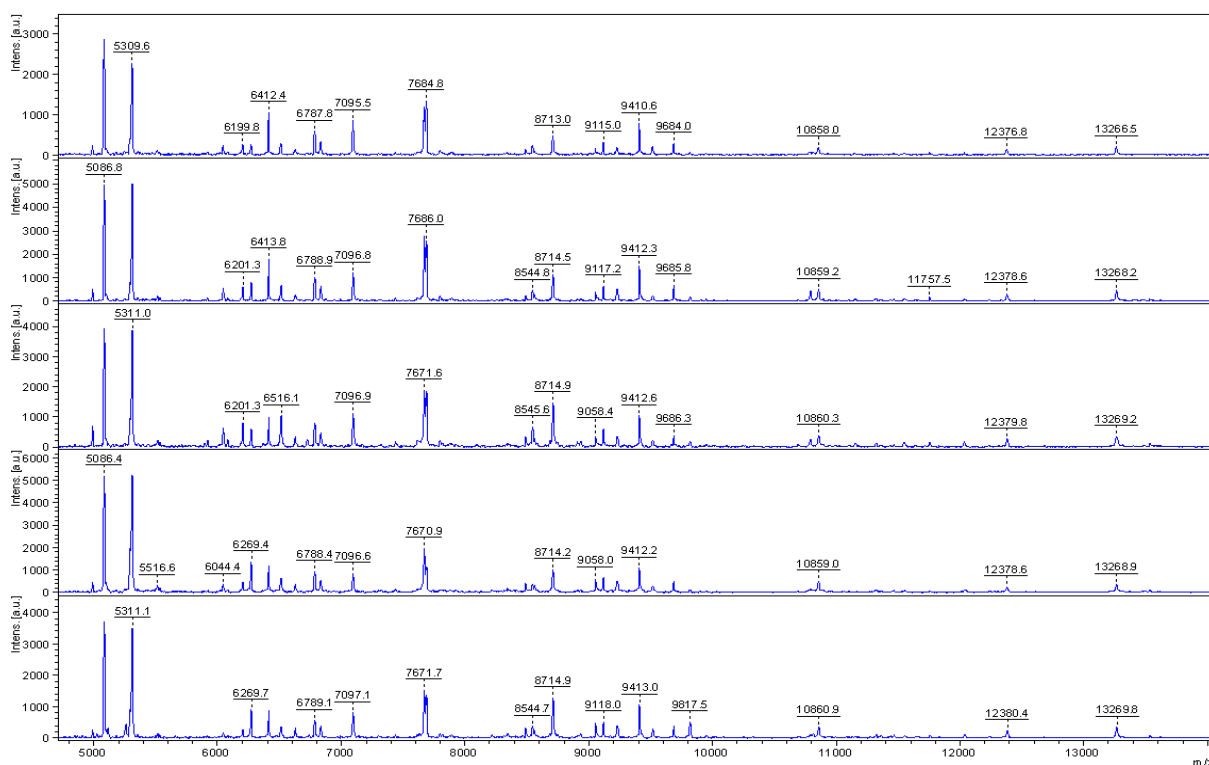


Obr. 4.2.4: Porovnání proteinových spekter flebotomů druhu *P. perniciosus*, zabitých v mrazu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo v 70% nedenaturovaném etanolu a homogenizovaných vodou či kyselinou mravenčí.

4.2.2 Proteinová spektra v rámci jednoho druhu

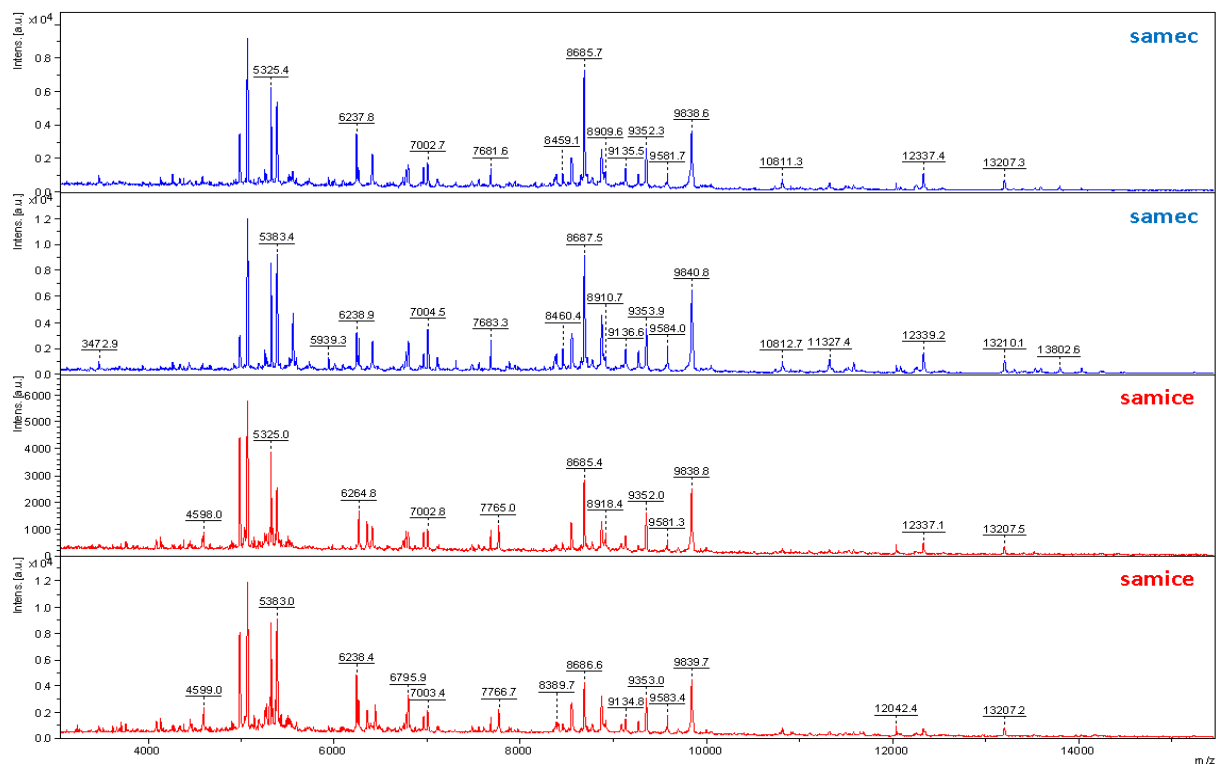
Aby mohla být metoda MALDI-TOF MS rutinně používána k určování různých druhů flebotomů, je důležité, aby proteinová spektra zástupců jednoho druhu byla stabilní a zároveň se dostatečně lišila od spekter zástupců jiných druhů. Zásadní jsou pak také další faktory, které mohou ovlivnit intenzitu či celkový profil spektra, jako třeba pohlaví a stáří jedince nebo přítomnost krve a vajíček u samic. Všechna spektra byla měřena vždy pro pět různých jedinců (samic nebo samců) daných druhů a každý vzorek byl na MALDI destičku nanesen dvakrát.

Shodnost a reprodukovatelnost spekter zástupců stejného druhu je dobře patrná z obrázku 4.2.5. Měření bylo v tomto případě opakováno s pěti různými samice a samci u každého druhu.



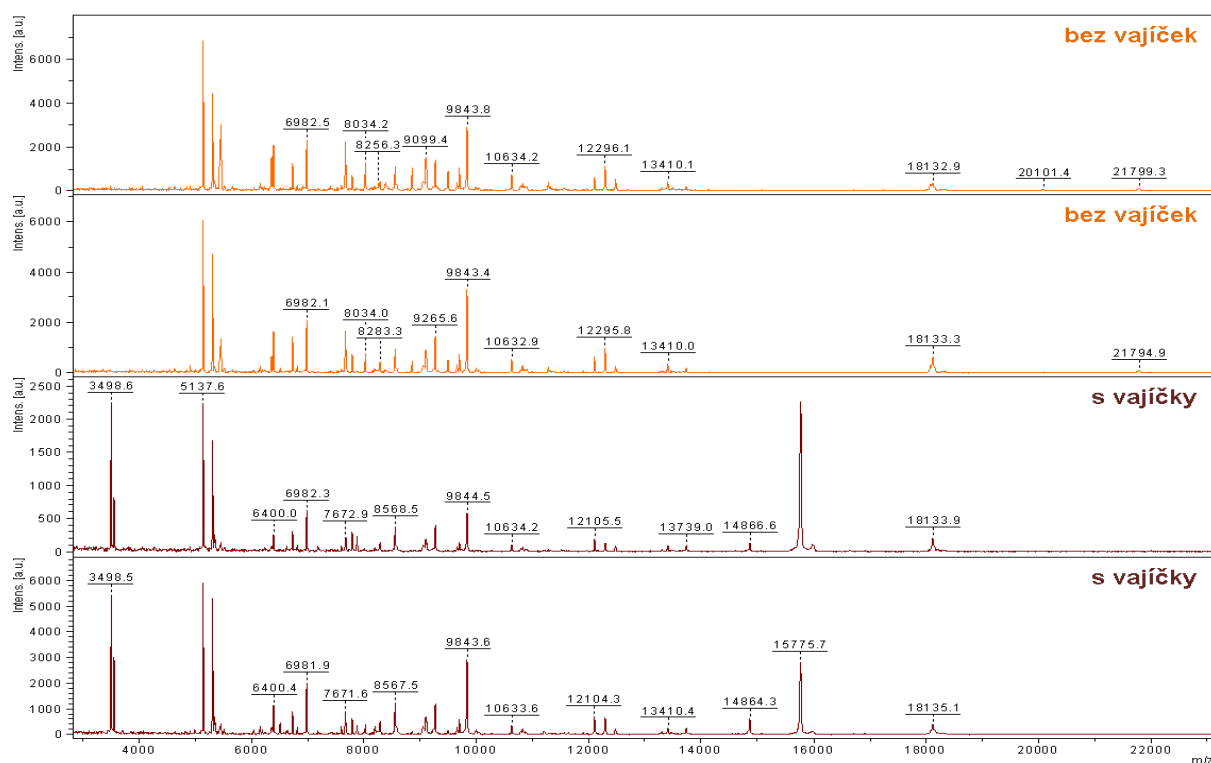
Obr. 4.2.5: Srovnání proteinových spekter pěti samic druhu *P. perniciosus*.

Rovněž spektra samic a samců stejného druhu jsou si velmi podobná; ačkoliv se v několika píčích liší, u obou pohlaví najdeme většinu shodných píků, jak je vidět na příkladu zástupců druhu *P. arabicus* na obrázku 4.2.6.



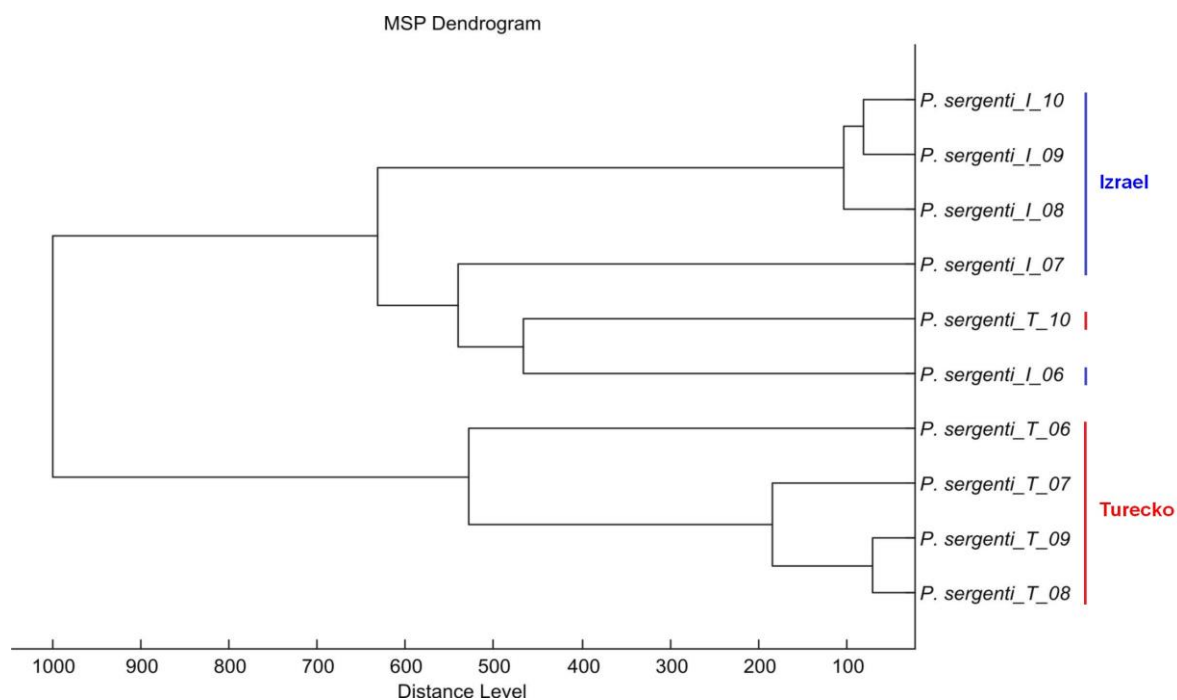
Obr. 4.2.6: Porovnání proteinových spekter dvou samců a dvou samic druhu *P. arabicus*.

U samic je také podstatná případná změna proteinového profilu způsobená přítomností vajíček. Vliv tohoto parametru byl měřen u 10 samic *P. argentipes* 10 dní po sání na myši BALB/c v porovnání s 10 samicemi *P. argentipes* živěnými pouze cukerným roztokem. Samicím byla pro tuto analýzu oddělena pouze hlava a zadeček s vajíčky byl spolu s hrudí homogenizován. Ačkoliv nebyly jednotlivé proteiny charakterizovány, ze spekter na obrázku 4.2.7 je dobře patrné, že proteiny vajíček se na spektru samice projevují.

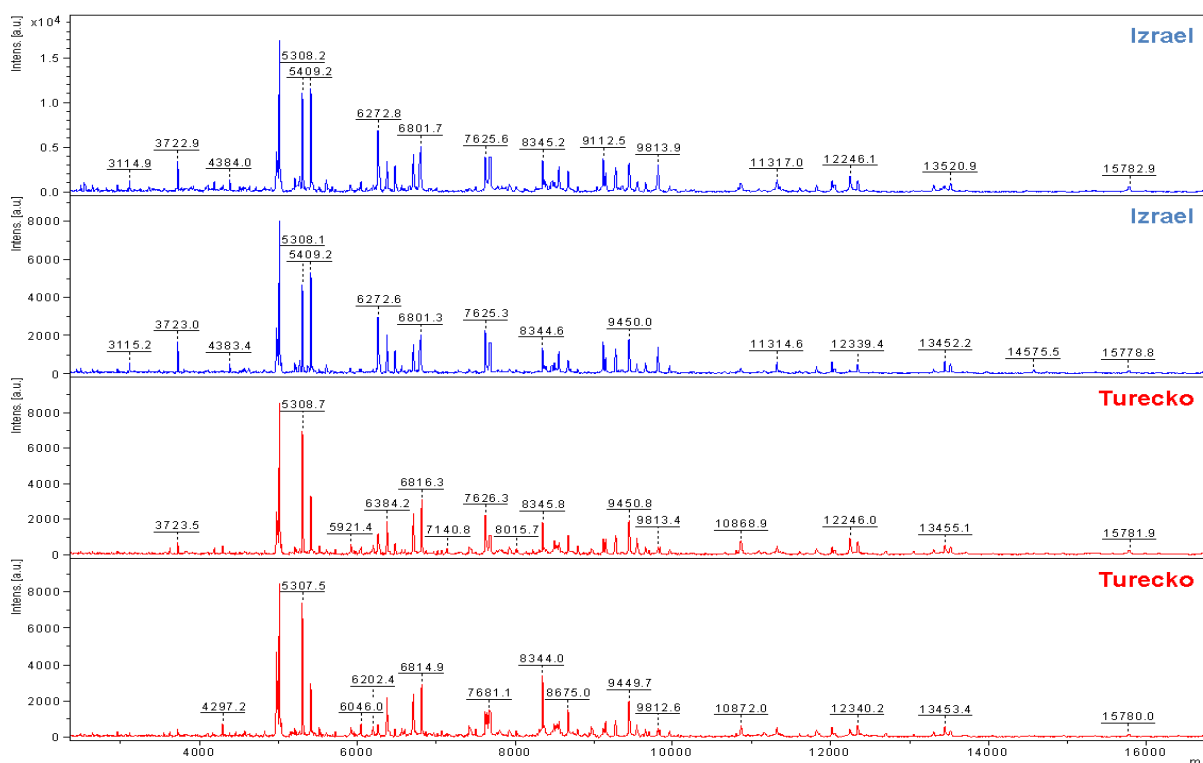


Obr. 4.2.7: Porovnání spekter čtyř samic *P. argentipes* s vajíčky a bez vajíček.

Citlivost metody rozlišit jednotlivé populace jednoho druhu, byla testována u zástupců *P. sergenti* ze dvou různých populací, izraelské a turecké. Na dendrogramu (obrázek 4.2.8), získaném na základě jejich spekter (obrázek 4.2.9), se obě populace, s výjimkou jednoho tureckého zástupce, rozdělily do dvou samostatných kladů podle geografického původu.



Obr. 4.2.8: Rozdělení dvou populací (izraelské a turecké) *P. sergenti* pomocí dendrogramu.

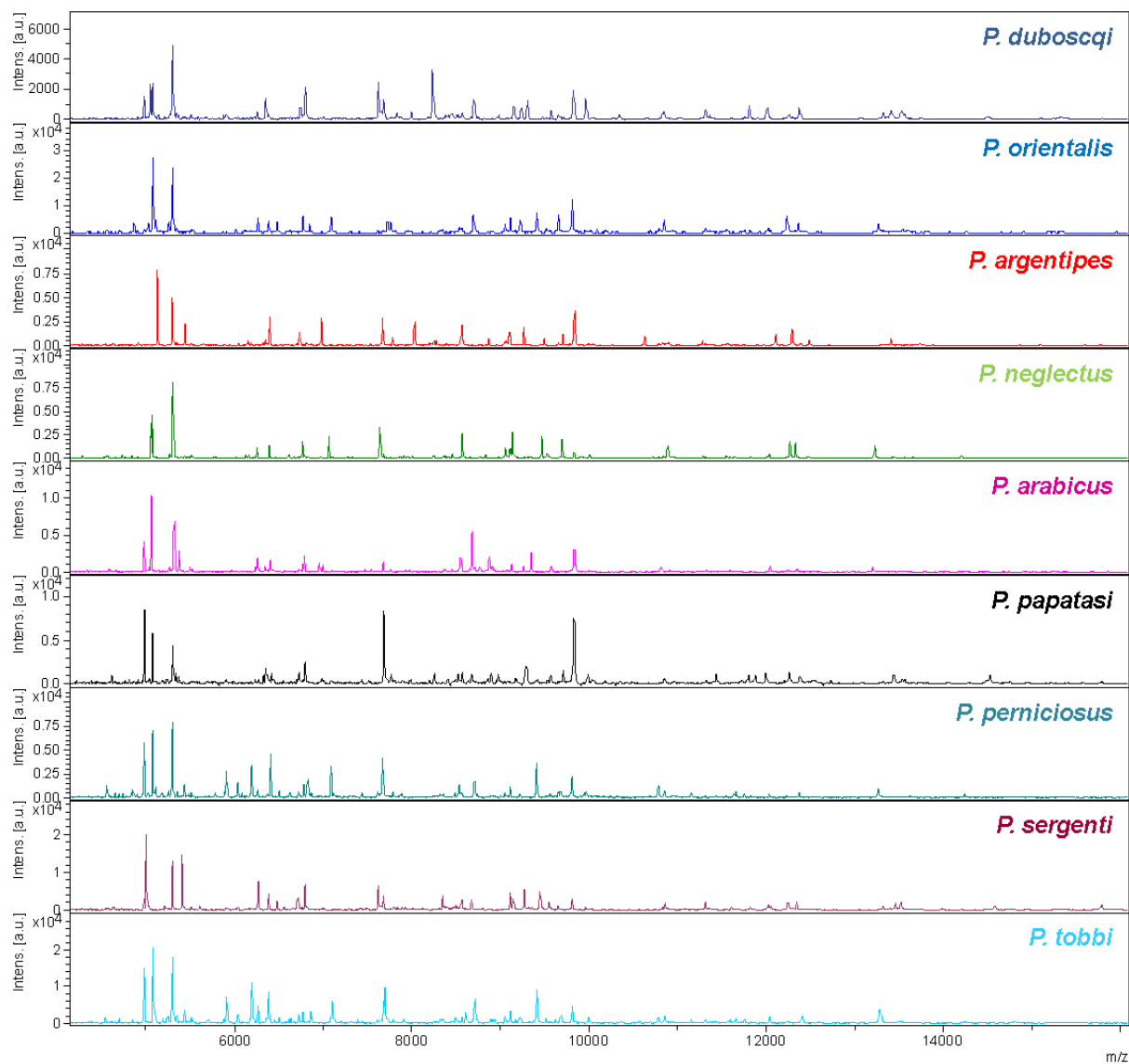


Obr. 4.2.9: Srovnání spekter dvou zástupců *P. sergenti* z izraelské populace a dvou jedinců z populace turecké.

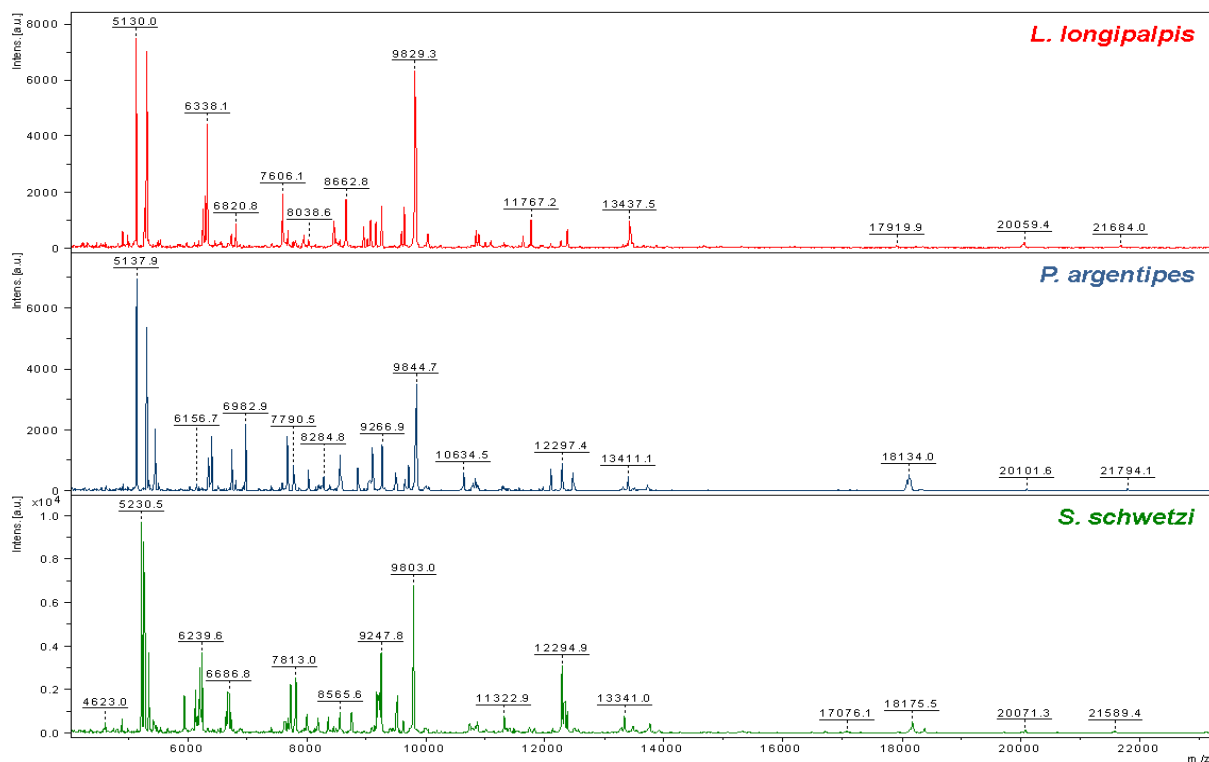
4.2.3 Proteinová spektra vybraných zástupců rodů podčeledi Phlebotominae

V rámci jednoho druhu zůstávají spektra konstantní, zatímco mezi jednotlivými druhy se liší, jak ukazují následující měření. Celkem bylo změřeno 110 jedinců náležících do tří rodů: *Lutzomyia*, *Phlebotomus* a *Sergentomyia*. Nejvíce druhů (devět) patří do rodu *Phlebotomus* a po jednom druhu jsou zastoupeny zbylé dva rody. V rámci rodu *Phlebotomus* jsou zastoupeny následující podrody: *Adlerius*, *Euphlebotomus*, *Larroussius*, *Paraphlebotomus* a *Phlebotomus*.

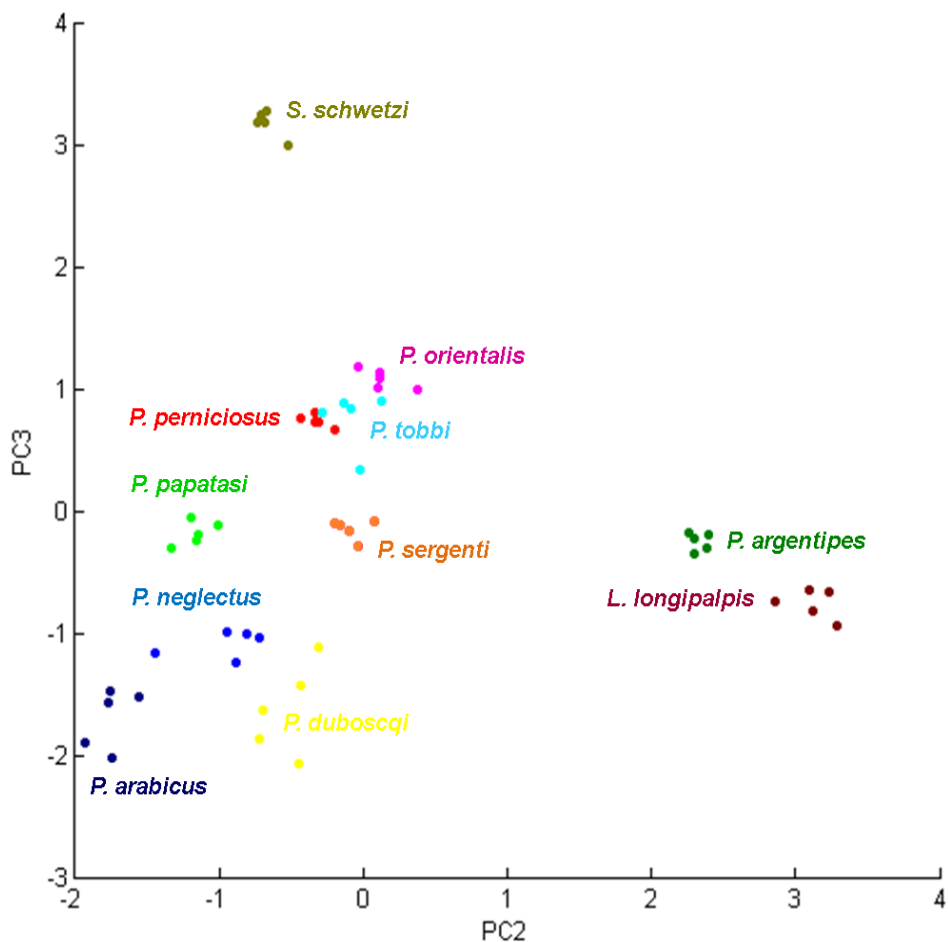
Všichni zástupci, s výjimkou *P. neglectus*, pocházejí z našich laboratorních kolonií a jejich spektra se navzájem liší a obsahují řadu druhově jedinečných píků, a to i spektra druhů blízce příbuzných v rámci jednoho podrodu. Obrázek 4.2.10 ilustruje, jak vypadají spektra jednotlivých druhů rodu *Phlebotomus*, na jejichž základě byl po vyhodnocení hierarchickou shlukovou analýzou (obrázek 4.2.12) pomocí programu MALDI Biotyper vytvořen dendrogram, na němž se analyzovaní jedinci rozdělili do jednotlivých kladů podle druhové příslušnosti (obrázek 4.2.13). Do tohoto vyhodnocení byla přidána ještě spektra rodů *Lutzomyia* a *Sergentomyia*. Srovnání jejich proteinových profilů i s rodem *Phlebotomus* je vidět na obrázku 4.2.11, z něhož je také patrné, že spektra těchto tří rodů se výrazně liší.



Obr. 4.2.10: Příklady proteinových spekter zástupců rodu *Phlebotomus*.

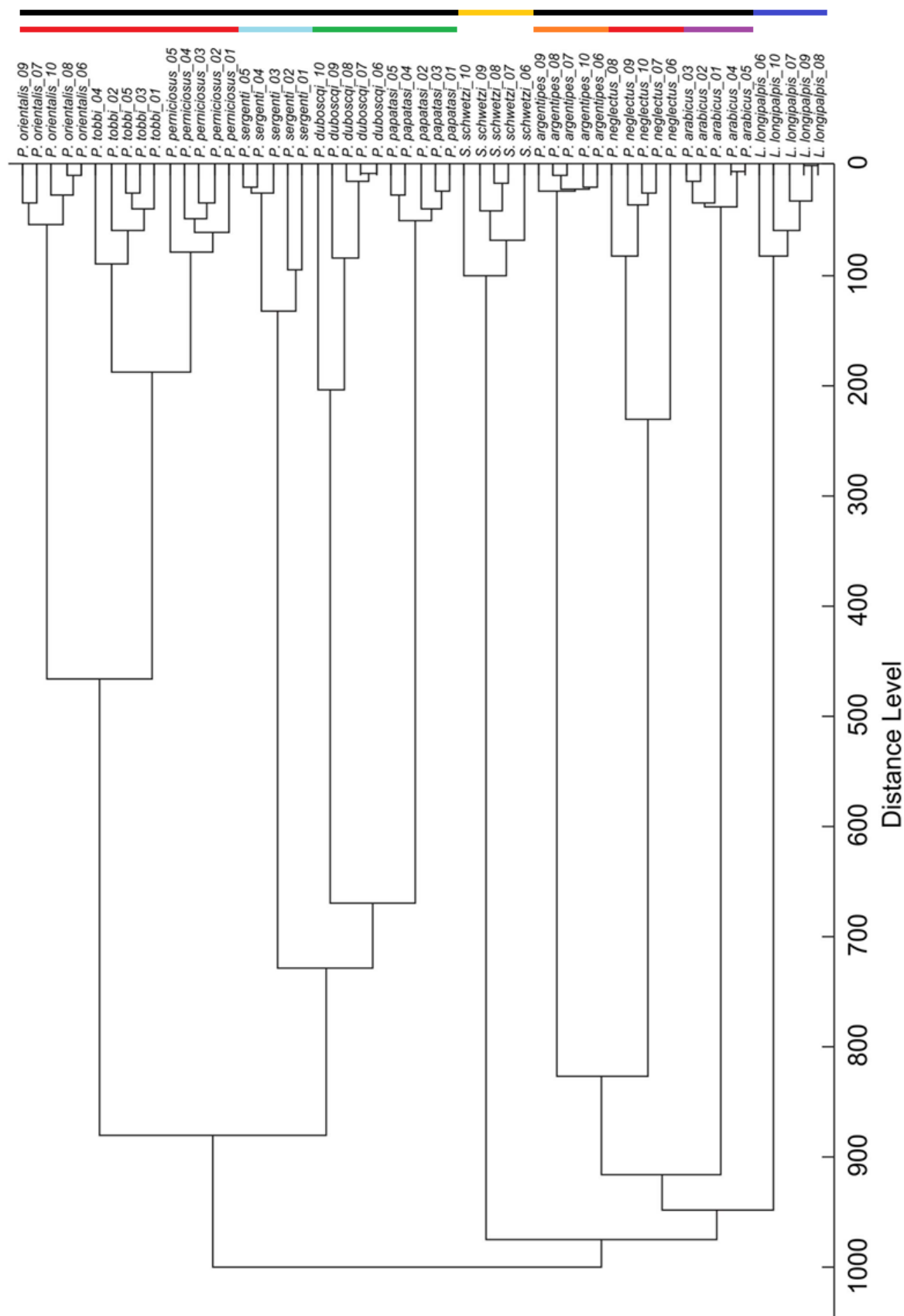


Obr. 4.2.11: Srovnání proteinových profilů zástupců rodů *Lutzomyia*, *Phlebotomus* a *Sergentomyia*.



Obr. 4.2.12: Vyhodnocení všech měřených druhů flebotomů hierarchickou shlukovou analýzou.

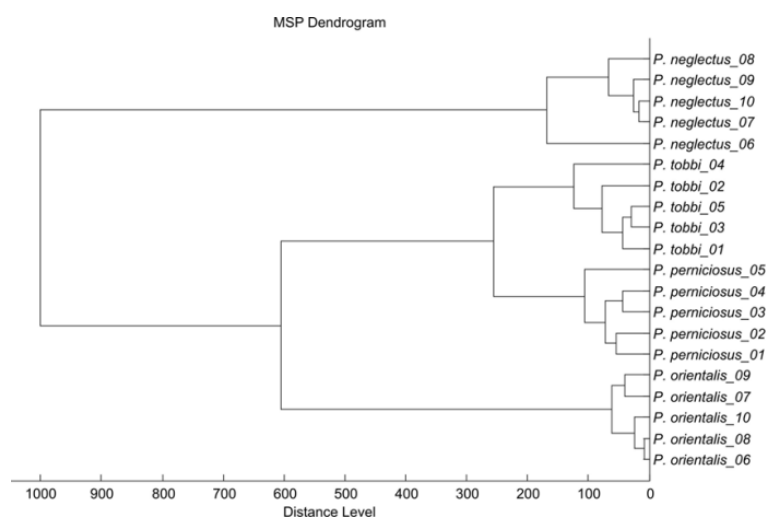
MSP Dendrogram



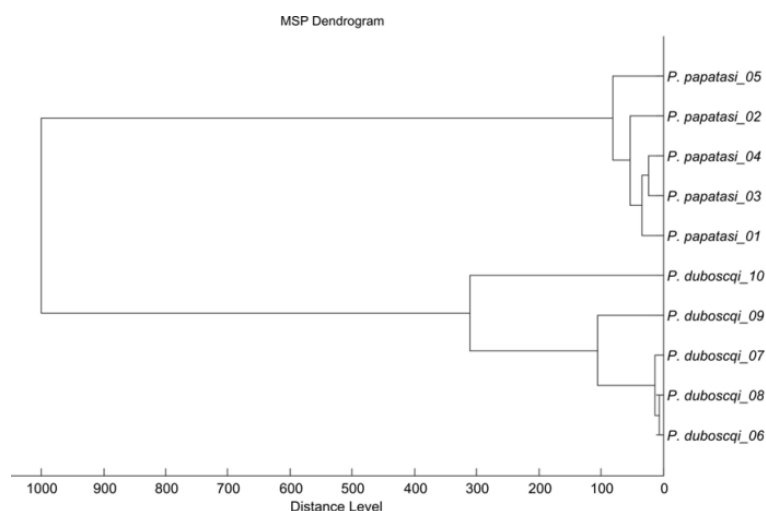
rody : **Lutzomyia** **Phlebotomus** **Sergentomyia**
 podrody : **Adlerius** **Euphlebotomus** **Larroussius** **Paraphlebotomus** **Phlebotomus**

Obr. 4.2.13: Dendrogram všech analyzovaných druhů.

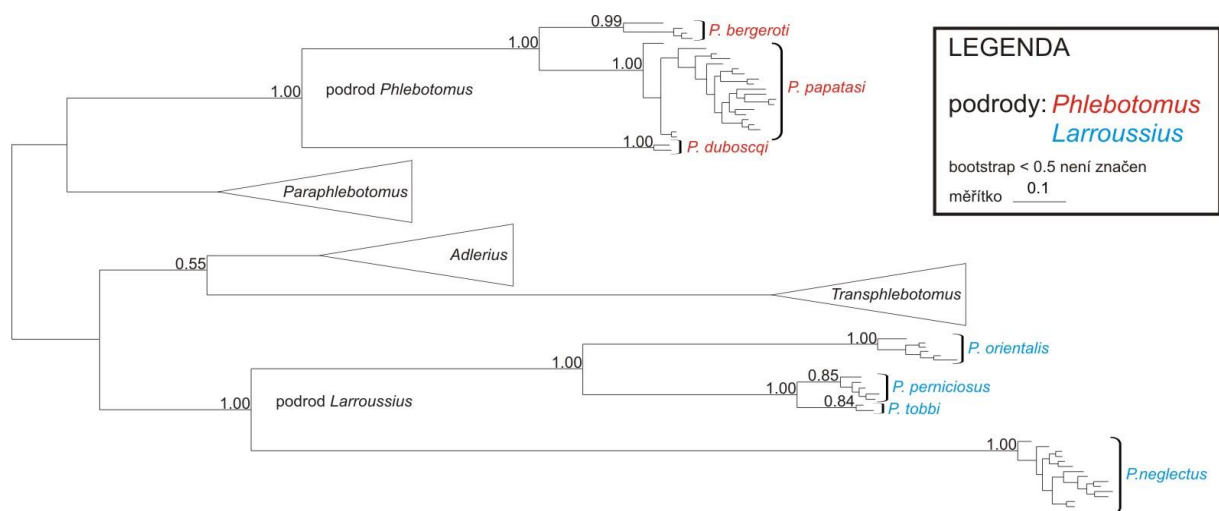
Na obrázcích 4.2.14 a 4.2.15 jsou dendrogramy dvou podrodů (*Larroussius* a *Phlebotomus*), které byly v naší analýze zastoupeny alespoň dvěma druhy. Na dendrogramu 4.2.14 je vidět, že *P. neglectus* je ostatním druhům podrodu *Larroussius* proteinovým spektrem poměrně nepodobný a na dalším obrázku 4.2.16 je tento fakt dokumentován i na fylogenetickém stromě rodu *Phlebotomus*, kde je také vidět, že příbuznost jednotlivých druhů odpovídá podobnosti jejich proteinových spekter. Srovnání spekter v rámci podrodu *Larroussius* ukazuje obrázek 4.2.17, z něhož je zřejmé, že zatímco *P. perniciosus* a *P. tobbi* mají mnoho společných píků, profil *P. neglectus* se ostatním druhům příliš nepodobá. Na obrázku 4.2.15 je z dendrogramu podrodu *Phlebotomus* nápadná vysoká variabilita zástupců druhu *P. duboscqi*; fylogram na obrázku 4.2.16 ukazuje, že vzdálenost jeho dvou zahrnutých druhů je větší než vzdálenost *P. orientalis* od *P. perniciosus* a *P. tobbi*, což odpovídá získanému dendrogramu (obrázek 4.2.13).



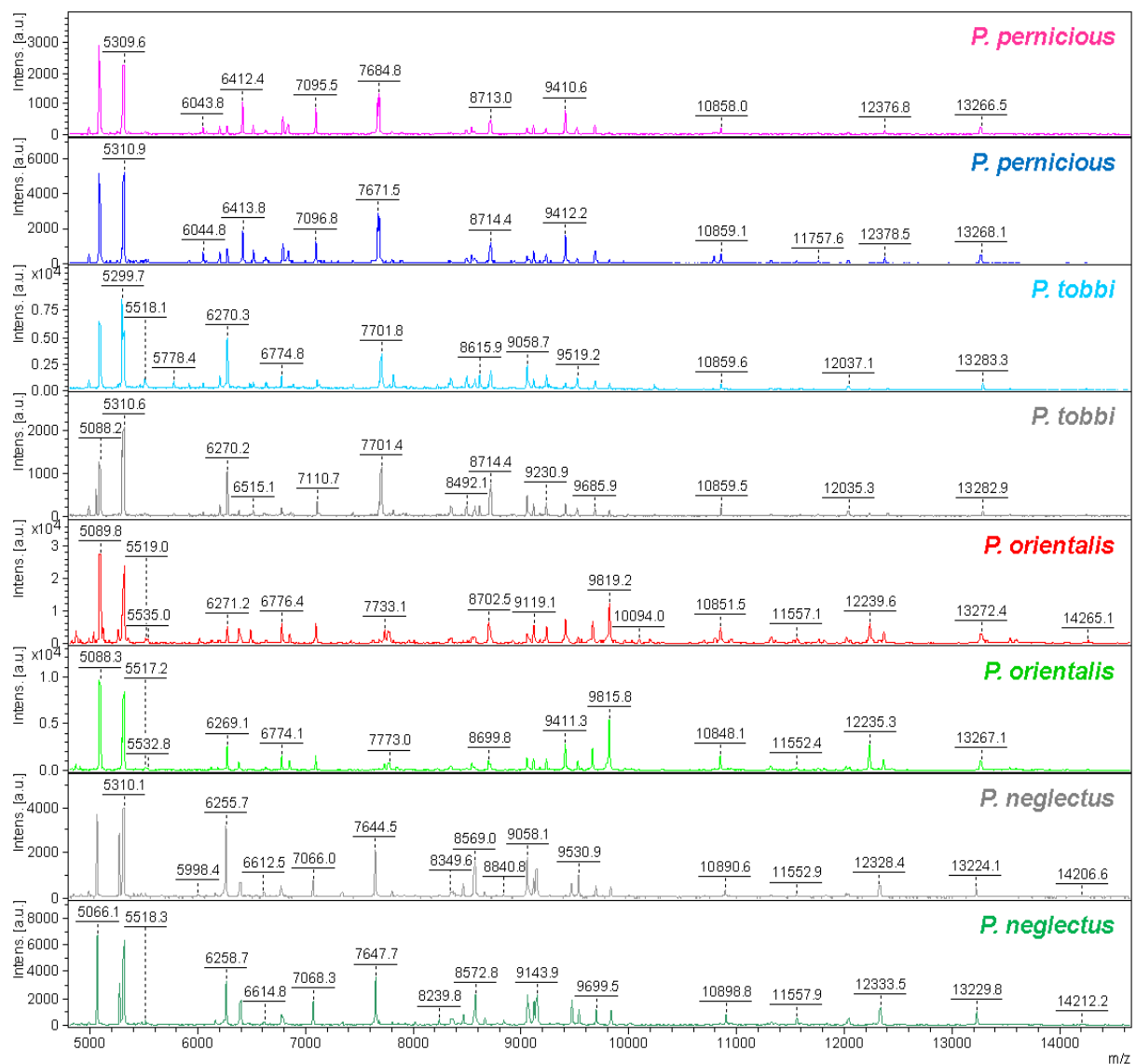
Obr. 4.2.14: Dendrogram podrodu *Larroussius*.



Obr. 4.2.15: Dendrogram podrodu *Phlebotomus*.



Obr. 4.2.16: Fylogram rodu *Phlebotomus* na základě sekvencí COI konstruovaný bayesovskou metodou.



Obr. 4.2.17: Srovnání spekter druhů podrodu *Larroussius*.

5.2 Diskuze

Metoda MALDI MS byla původně vyvinuta jako postup pro charakterizaci peptidů a proteinů, doplnění detektoru doby letu (time of flight, TOF) následně umožnilo měřit i vyšší molekulové hmotnosti a metoda MALDI-TOF MS se začala používat k analýze nejrozličnějších molekul. Postupem času se vyvinula i ve spolehlivou a specifickou alternativu k určování nejen lidských patogenních mikroorganismů, a to i v klinické praxi. Metoda je dostatečně citlivá na odlišení nejenom druhů, ale i poddruhů a epidemiologicky závažných kmenů bakterií (Seng *et al.* 2010). Teprve relativně nedávno pak byla aplikována na eukaryotické organismy včetně těch mnohobuněčných. U hmyzu byla poprvé vyzkoušena při identifikaci blízkých druhů ze skupiny *Drosophila melanogaster* a jednotliví zástupci byli přesně rozděleni do svých druhových skupin (Campbell 2005). Právě správné určení jedinců do druhu je klíčové, ale u mnoha skupin hmyzu velmi obtížné.

V případě morfologického určování flebotomů se jedná o diagnostiku založenou na znacích, které mohou být i v rámci jednotlivých druhů značně variabilní. Řada těchto znaků se nachází na palpách či tykadlech, které se při manipulaci se vzorkem snadno ztratí či poškodí, případně na hrudi, která se používá pro izolaci DNA, a tudíž tyto znaky jsou opět mimo náš dosah. Přehled morfologických znaků rodu *Phlebotomus* najdeme např. v Lewisově taxonomické studii z roku 1982. Morfologické určování však především vyžaduje zkušenost, praxi a je časově velice náročné, neboť jeho nutnou podmínkou je vytvoření trvalých preparátů v zalévacím médiu a následná morfologická analýza s využitím kvalitního mikroskopu s možností přesných měření některých délkových znaků.

Alternativou k pracné morfologické identifikaci se časem staly molekulární metody, a to hlavně sekvenční analýza vybraných genů a negenomických úseků (COI, Cyt b, ITS, EF, SSU a další). Na základě sekvence vnitřního přepisovaného mezerníku (internal transcribed spacer, ITS2) byl potvrzen status druhu pro morfologicky téměř identické druhy *P. sergenti* a *P. similis* (Depaquit *et al.* 2002). Pomocí sekvenace mitochondriálního genu ND4 (gen pro podjednotku 4 NADH dehydrogenázy) je zase možné spolehlivě určit zástupce podrodu *Transphlebotomus*, jejichž morfologická identifikace je velice těžká. Jedinci z tohoto podrodu se velice podobají zástupcům podrodu *Adlerius*, kam je v roce 1948 zařadil Theodor, ale i druhům podrodu *Larrousius*, kam byli posléze přearženi Lewisem v roce 1982. Na rozdíl od nepříliš charakteristických znaků u samců, samice lze odlišit na základě tvaru spermatéky (Depaquit *et al.* 2005). Dle sekvencí genu pro cytochrom b (Cyt b) se podařilo rozlišit i tři

zástupce komplexu *P. major* v Turecku, kteří se morfologicky liší jen některými délkovými znaky, např. spermaduktů, koxitu a stylu (Kasap, Votypka *et* Alten 2013).

Molekulární metody ovšem zahrnují mnoho kroků, jako je izolace DNA, amplifikace, vizualizace amplikonu pomocí gelové elektroforézy a následná sekvenace, čímž se stávají také zdoluhavými a i přes obecné snížení nákladů relativně finančně náročnými. Oproti tomu je metoda MALDI-TOF MS rychlejší a levnější, jelikož protokol je nenáročný a krátký, stejně tak pak samotné měření a vyhodnocení. V případě dobře zpracovaného a standardizovaného protokolu je tato metoda i dostatečně robustní k spolehlivé a rutinní identifikaci. Z těchto důvodů je to vhodný postup pro aplikaci v epidemiologických studiích či v průzkumech biodiverzity, kde se zpracovává velké množství vzorků. MALDI-TOF MS by mohlo sloužit i jako předvýběr zajímavých exemplářů, které by byly následně podrobeny zpracování pomocí jiné metody. Pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS je totiž možné použít jen část těla jedince, jelikož je vyžadováno pouze malé množství vstupního materiálu, další části těla se tak dají vyšetřit jinými postupy. V případě flebotomů je možnost použití hrudi na analýzu pomocí MALDI-TOF, přední části abdomenu na izolaci DNA a posledních článků abdomenu a hlavy na morfologické vyšetření.

V rámci této diplomové práce jsem analyzovala více než 500 zástupců tří rodů čeledi Phlebotominae pomocí metody MALDI-TOF MS, optimalizovala přípravu vzorků a částečně osvětlila problémy a faktory, které mohou ovlivnit kvalitu a podobu získaného spektra.

Proteinové profily byly měřeny v rozsahu 2 000 až 25 000 Da a píky se objevovaly přibližně v rozmezí od 4 000 do 22 000 Da. Nejvíce píků se pak nacházelo mezi 5 000 až 10 000 Da, a píky s největší intenzitou, tedy nejlépe ionizovatelné, nikoliv nejčastější proteiny, se objevovaly v oblasti kolem 5 000 až 6 000 Da. Vzhledem k úzké detekovatelné oblasti je jasné, že jen velmi malé množství proteinů přítomných ve vzorku se podílí na profilu spektra. Přesto je možné pouze na základě vizuální kontroly odlišit dle těchto spekter dva druhy. V některých případech se hmotnosti proteinových píků liší jen několika málo daltony, které by pravděpodobně mohly odrážet aminokyselinové záměny nebo post-translační modifikace.

Proteinová spektra byla měřena z hrudi flebotomů, a to z důvodu nejmenší možnosti ovlivnění spektra pohlavím, potravou a v případě samic též přítomností vajíček či nasáté krve. Spektra by mohla být ovlivněna i změnami působenými stárnutím organismu, ale tato domněnka se zatím nepotvrdila. V našem případě byli flebotomové z kolonií vybírání náhodně bez ohledu na jejich stáří a stejně tomu bylo ve studii příbuzných druhů komplexu *D. melanogaster*, kde též nebyl zaznamenán žádný vliv (Campbell 2005). U zástupců rodu

Culicoides byli měřeni jedinci různého stáří, ale rozdíly ve spektrech byly minimální a zanedbatelné (Kaufmann *et al.* 2011). Stejně tak se zdá, že ani rozdílná potrava nijak neovlivňuje získané proteinové profily (Perera, Vargas *et al.* 2005). Pohlavně specifické proteiny by se však na spektru projevit mohly, jelikož pomocí MALDI-MS byl zachycen protein pohlavních žláz samců (PEB2, 4977,6 Da) u homogenátů z celého těla *D. melanogaster* (Feltens *et al.* 2010). V případě měření proteinů z homogenátů jedinců bez abdomenu, v našem případě i bez hlavy, je vliv pohlaví na profil spektra minimální. Samice a samci se pochopitelně liší v několika pících (např. v oblasti kolem 11 000 Da), ale rozdíly nepřesahují variabilitu píků v rámci druhu. Ke stejnému závěru došla i studie zástupců rodu *Culicoides*, kde byly měřeny jak homogenáty jen z hrudi, tak z celého těla bez abdomenu (Kaufmann *et al.* 2011) a též studie komplexu *D. melanogaster*, kde byly dokonce měřeny proteiny z celého těla (Campbell 2005).

V případě přítomnosti vajíček či nasáté krve v měřeném homogenátu, tedy když nedojde k oddělení abdomenu, je jejich vliv na získané spektrum veliký. Proteiny vajíček doplňují vlastní píky do spektra a tak může dojít k nesprávnému zařazení vzorku do skupiny druhů, ale pravděpodobně neovlivňují intenzitu spektra. Vliv přítomnosti nasáté krve jsme zatím netestovali, ale dá se předpokládat, že výsledek by byl podobný, jako u nasátých samic rodu *Culicoides*, kde přítomnost krve způsobila pokles intenzity celého spektra a tudíž i charakteristických píků nutných k určení druhu. Efekt krve byl slabší již po dvou dnech od sání a prakticky nezaznamenanatelný pět dní po sání. V případě oddělení abdomenu pak k žádnému ovlivnění spektra krví nedošlo (Kaufmann *et al.* 2011). Abdomen by měl být tedy vždy před homogenizací vzorku oddělen, jelikož u hematofágního hmyzu nemusí být vždy zřetelné, zda samice je nasátá, a navíc později obsahuje abdomen již vytvořená vajíčka, jejichž vliv na podobu spektra je výrazný.

Alternativou k homogenizaci hrudi může být použití pouze nohou, jak tomu bylo u komárů (Yssouf *et al.* 2013a) a klíšťat (Yssouf *et al.* 2013b), případně křídel u glossin (Hoppenheit *et al.* 2013a). U flebotomů však pro malou velikost těchto tělních okrsků nepřipadá tato varianta jako vhodná. U zástupců rodu *Glossina* byla změřena proteinová spektra jak celého těla, tak jeho různých částí (abdomen, hlava, hrud', křídla a nohy); tato spektra se navzájem sice výrazně lišila, avšak jen intenzitou jednotlivých proteinových píků. Všechny části těla tak poskytly spolehlivé profily, na jejichž základě bylo možné provést určení do druhu, a to bez ohledu na pohlaví vzorku (Hoppenheit *et al.* 2013a). Profily vzorků měřených jen z proteinů hrudi a z homogenátů hrudi, hlavy, křídel a nohou se nijak nelišily (Kaufmann *et al.* 2011).

Základním faktorem, který také může zásadně ovlivnit kvalitu získaného spektra, je skladování a příprava vzorku. Jednotlivé vzorky byly skladovány v různě koncentrovaném denaturovaném a nedenaturovaném etanolu při laboratorní teplotě či nasucho v mrazu a homogenizovány buď ve vodě, nebo kyselině mravenčí. Denaturovaný etanol poskytoval nejhorší spektra s vysokým šumem základní linie, nízkou intenzitou píků a další pokusy byly proto již prováděny pouze s nedenaturovaným etanolem. Nejlepší spektra, obsahující nejvíce proteinových píků, byla sice získána ze vzorků skladovaných v mrazu a homogenizovaných vodou, ovšem skladování flebotomů v teplotě -20 °C není v případě terénní práce vždy možné a jako optimální tak bylo z praktického hlediska zvoleno jejich skladování v 70% nedenaturovaném etanolu a homogenizace v kyselině mravenčí. Pro možnost následného vyšetření vzorků i metodou sekvenace DNA by byla výhodnější homogenizace flebotomů ve vodě, jelikož na rozdíl od kyseliny mravenčí nedegraduje DNA. Vzorky skladované v 70% etanolu a homogenizované ve vodě však poskytovaly nereprodukovatelná spektra. Stejně tak bylo zamítnuto skladování vzorků v 96% nedenaturovaném etanolu, jelikož krystalizace na MALDI destičce byla nehomogenní a spektra tak nebyla příliš kvalitní a reprodukovatelná. Nehomogenní krystalizaci působí též kyselina mravenčí ve vyšší (50%) koncentraci a lépe je tedy použít její nižší (25%) koncentrace (Kaufmann *et al.* 2011). Spektra získaná ze vzorků uložených v 70% etanolu a homogenizovaných v kyselině mravenčí byla velice kvalitní, ale navíc se v dalších měřeních ukázala jako nejlépe reprodukovatelná. Tyto profily sice obsahovaly méně proteinových píků oproti vzorkům skladovaným v mrazu, ale zato byly intenzivnější, ačkoliv s délkou skladování jejich intenzita klesala, což se projevilo především na proteinových pících ve vyšších molekulových hmotnostech. Přesto i po 75 dnech vzorky poskytovaly dobrá a specifická spektra. Podobný efekt byl sledován u dlouho skladovaných zástupců rodu *Culicoides*, i zde bylo spektrum méně intenzivní po delším pobytu v 70% etanolu (Kaufmann *et al.* 2011).

Pro vytvoření referenční databáze spekter je tudíž vhodné použít co nejčerstvější materiál, přesto i vzorky skladované dlouhou dobu v etanolu je posléze možné správně přiřadit do druhů, tedy k jejich referenčním spektrům, pokud jsou zachovány charakteristické píky. Dva nejstarší exempláře, které jsme proměřili, byli *P. sergenti* a *P. tobbi* chycení v červnu 2013 v Ázerbájdžánu a následně uloženi osm měsíců v 96% nedenaturovaném etanolu při teplotě 4 °C. Spektrum *P. tobbi* je na proteinové píky chudé a jejich intenzita je méně než poloviční oproti spektru *P. tobbi* uloženého v 70% etanolu jen tři dny při laboratorní teplotě. Takové spektrum již neobsahuje dostatek proteinových píků, aby mohlo být správně přiřazeno k referenčnímu spektru *P. tobbi*. U *P. sergenti* ke snížení intenzity

spektra, ani vymizení píků ve vyšších molekulových hmotnostech nedošlo, přestože vzorky byly chyceny ve stejnou dobu a skladovány stejným způsobem. Rozdíly ve spektrech jsou nejspíše opět důsledkem nehomogenní krystalizace vzorků skladovaných v 96% etanolu. Úspěšné přiřazení vzorků k referenčním spektrům se povedlo i u tiplíků skladovaných v 70% etanolu po dobu dvou let při teplotě 4 °C (Kaufmann *et al.* 2012a).

Jako MALDI matrice byla od počátku používána kyselina sinapová rozpuštěná v acetonitrilu a kyselině trifluoroctové, na základě jejích dobrých výsledků z předchozích studií (např. Feltens *et al.* 2010, Kaufmann *et al.* 2011, 2012a,b). Druhou velmi používanou matricí je kyselina skořicová rozpuštěná v acetonitrilu a kyselině trifluoroctové (např. Hoppenheit *et al.* 2013a,b, Yssouf *et al.* 2013a,b), kterou jsme ale netestovali. MALDI matrice slouží k absorpci energie laseru, díky které se rozkládá a ionizuje tak molekuly vzorku, jelikož při ionizaci vzorku bez přítomnosti matrice dochází k jeho nežádoucímu štěpení.

Metoda MALDI-TOF MS poskytuje v rámci studovaného druhu flebotoma stabilní a reprodukovatelná spektra, což umožňuje její použití k identifikaci neznámých vzorků, máme-li k dispozici dostatečně velkou referenční databázi. Všechny druhy zahrnuté v naší studii klastrovaly jen s jedinci stejného druhu a v rámci jednoho klastru nikdy nedošlo k smíchání dvou různých druhů. Ačkoliv intenzita jednotlivých píků je v rámci spekter jednoho druhu variabilní, spektra jsou přesto rozpoznána jako stejná a jejich intenzita není pro tuto analýzu příliš důležitá. Správně byla rozeznána i spektra druhů blízce příbuzných v rámci jednoho podrodu (*Larroussius*, *Phlebotomus*), stejně tak byly správně určeny blízké druhy komplexu *D. melanogaster* (Campbell 2005) či dva kryptické druhy tiplíků *Culicoides grisescens* I a *C. grisescens* II (Kaufman *et al.* 2012a). Ve druhé studii zabývající se rodem *Drosophila* se však podobné rozlišení zástupců nepovedlo a jako minimální vzdálenost pro oddělení příbuzných druhů byla stanovena hranice tří milionů let (Feltens *et al.* 2010). Rozdíl ve výsledcích je pravděpodobně způsoben použitím jiných látek k extrakci proteinů ze vzorků. Oproti dvěma prvním studiím, kde byla použita k homogenizaci kyselina mravenčí, v té z roku 2010 autoři zvolili 6M močovinu rozpuštěnou v 50mM Trisu a kyselině chlorovodíkové, jelikož ten samý homogenát je posléze možné použít na izolaci DNA pro sekvenční analýzu.

Výsledky některých studií naznačují, že rozlišovací schopnost metody MALDI-TOF MS zřejmě může i u eukaryotních mnohobuněčných organismů včetně hmyzu sahat na nižší taxonomickou úroveň než je druh. Při měření spekter různých druhů komárů (čeleď *Culicidae*) se podařilo rozlišit molekulární formy M a S laboratorně chovaných komárů druhu

Anopheles gambiae, které se liší schopností přenášet plasmodia (Yssouf *et al.* 2013a). V další studii bylo toto rozlišení potvrzeno také u laboratorně chovaných kolonií *A. gambiae*, zatímco u volně chycených zástupců těchto dvou molekulárních forem se nepovedlo. Důvodem může být, že rozdíly mezi laboratorně chovanými komáry, na jejichž základě byl vytvořen SDA (shrinkage discriminant analysis) model, nejsou dostatečně výrazné u volně chycených zástupců (Mueller *et al.* 2013).

U druhů *Glossina palpalis gambiensis* a *G. tachinoides* chycených v Burkině Faso na asi 60 km vzdálených místech se dokonce podařilo rozlišit i dvě různé populace stejného druhu. Oddělení je patrně důsledkem různé exprese proteinů u těchto populací vlivem odlišných podmínek v místě jejich původu. Metoda MALDI-TOF MS by tak mohla sloužit i k monitoringu jednotlivých populací (Hoppenheit *et al.* 2013b). My jsme do naší analýzy zahrnuli pět jedinců z obou laboratorně chovaných populací (izraelské a turecké) *P. sergenti* a až na jednoho zástupce turecké skupiny, který je na dendrogramu pohromadě s izraelskými flebotomy, se ostatní jedinci rozdělili do dvou klastrů podle svého geografického původu. U nízkého počtu testovaných jedinců se nám rozdělení populací podařilo, v budoucnu je však třeba otestovat, zda je metoda stejným způsobem schopna rozdělit větší počet jedinců, odchycených přímo z divokých populací.

Jak již bylo řečeno, všechny námi zahrnuté druhy mají unikátní a charakteristické spektrum, na jehož základě je možné je odlišit. Vzhledem k tomu, že spektra jsou rozlišována podle svojí podobnosti, předpokládali jsme, že spektra druhů jednoho podrodu si budou navzájem podobnější mezi sebou, než se spektra zástupců jiných podrodů. Tento předpoklad splnily všechny druhy z laboratorních kolonií, nikoliv však zástupci *P. neglectus*, odchycení z divokých populací na Krétě. Tento druh je dle dendrogramu podobnější fylogeneticky poměrně vzdálenému druhu *P. (Euphlebotomus) argentipes* než ostatním zástupcům svého podrodu *Larrousius*. Rozpor pravděpodobně není způsoben kvalitou spektra, jelikož profil druhu *P. neglectus* odpovídá profilům ostatních druhů z podrodu co do počtu i intenzity píků. Nicméně není jasné, zda spektra volně chycených jedinců nemohou být ovlivněna jejich momentálním fyziologickým stavem či přítomností patogenů, protože oba tyto faktory by mohly ovlivnit expresi proteinů, a tím i výsledný profil spektra. Tyto profily by poté nemusely odpovídat dříve získaným druhovým profilům z laboratorních kolonií. K potvrzení této domněnky bude třeba provést porovnání jedinců stejného druhu z přírody a z laboratorní kolonie. K tomu jsem ovšem neměla k dispozici vhodný materiál z přírodních populací námi chovaných druhů.

Ostatní druhy z podrodu *Larroussius* (*P. orientalis*, *P. perniciosus* a *P. tobbi*) jsou na dendrogramu pohromadě na jedné větvi. Z těchto tří jsou si *P. perniciosus* a *P. tobbi* podobnější, jelikož sdílejí větší množství identických proteinových píků mezi sebou než s druhem *P. orientalis*. Tato podobnost je patrná i z dendrogramu a shlukové analýzy. Tyto dva druhy jsou si ostatně nejvíce podobné ze všech devíti druhů rodu *Phlebotomus*. Tato podobnost odpovídá i fylogenetické příbuznosti zmíněných druhů na základě fylogramu konstruovaného ze sekvencí cytochrom oxidázy I (COI) bayesovskou metodou. *Phlebotomus perniciosus* a *P. tobbi* jsou si velmi blízcí oproti druhu *P. orientalis* a zástupci *P. neglectus* jsou jim v rámci podrodu *Larroussius* vzdáleni.

Zástupci druhého podrodu, *Phlebotomus*, který byl zastoupen dvěma druhy, jsou na dendrogramu též v rámci jedné větve, ale *P. duboscqi* a *P. papatasi* jsou si méně podobní než předchozí tři druhy podrodu *Larroussius*. I zde odpovídá podobnost spekter druhů jejich fylogenetické vzdálenosti, vypočtené z bayesovského fylogramu na základě sekvencí COI. V podrodu *Phlebotomus* je *P. papatasi* blíže *P. bergeroti* nežli *P. duboscqi* a vzdálenost těchto dvou druhů je větší než vzdálenost *P. orientalis* od *P. perniciosus* a *P. tobbi*. Přestože metoda MALDI-TOF MS, na rozdíl od sekvenace DNA, primárně nijak nestuduje fylogenezi zkoumaných zástupců, ale pouze je sdružuje na základě podobnosti jejich proteinového profilu, výsledky získané analýzou laboratorních druhů flebotomů odpovídají i jejich fylogenezi.

Zajímavá je ještě vysoká variabilita zástupců v rámci druhu *P. duboscqi*, viditelná jak z dendrogramu, tak shlukové analýzy. Laboratorní kolonie často vznikají z nevelkého počtu zakládajících jedinců a jedná se tak spíše o homogenní populace. Je otázka, zda se tento fenomén podílí na zjevné vysoké homogenitě studovaných jedinců druhů *P. arabicus*, *P. argentipes* a *P. papatasi*.

S problémem špatné klasifikace volně chycených zástupců se potýkali autoři studie komplexu druhů *Anopheles gambiae*. Jen 105 ze 125 zahrnutých jedinců bylo správně rozpoznáno, z těchto 105 jich navíc 19 bylo od larválního stádia dochováno v laboratoři a celkem 20 chycených dospělců bylo tak špatně identifikováno, přičemž na vině je pravděpodobně právě přítomnost krve, vajíček či patogenů ve vzorcích (Mueller *et al.* 2013). Metoda MALDI-TOF MS se přesto zdá jako vhodná pro použití k zpracování velkého množství vzorků z terénních sběrů. Úspěšně tak byla analyzována fauna tiplíků ve Švýcarsku, kde z 1 200 vybraných jedinců se 1 173 podařilo správně zařadit, 14 nebylo rozpoznáno, jelikož chybělo jejich referenční spektrum, a jen 13 dospělců nemohlo být zařazeno kvůli

špatnému proteinovému profilu. Mimo to rozdíly mezi dříve měřenými laboratorními tiplíky a volně chycenými zástupci stejného druhu byly minimální (Kaufmann *et al.* 2012b).

Na základě výsledků, předkládaných v této diplomové práci, bude dalším krokem vybudování referenční databáze spekter co možná největšího počtu druhů podčeledi Phlebotominae. Tato databáze by měla obsahovat spektra jak samic, tak samců, ačkoliv rozdíly mezi nimi jsou zanedbatelné. Z hlediska epidemiologie jsou pro nás sice zajímavé pouze samice, jakožto krev sající a podílející se na přenosu patogenů, ale při studiu biodiverzity jsou důležití i samci. Jedno referenční spektrum by mělo být založeno alespoň na pěti různých jedincích (Kaufmann *et al.* 2012a,b), aby byla pokryta variabilita píků v rámci druhu.

6 Závěr

Celkem bylo zalito 536 zástupců rodu *Sergentomyia*, 330 z nich bylo morfologicky zařazeno a ze 185 byla izolována DNA. Na základě morfologie a sekvenační analýzy založené na genech pro COI a Cyt b se nám podařilo určit 11 druhů, z nichž 10 spadá do rodu *Sergentomyia* a poslední tvoří pravděpodobně vlastní rod. Všechny druhy vytvořili samostatné klady a to shodně v obou analýzách.

Identifikace pouze na základě morfologických znaků se ukázala jako nedostatečná a taxonomie rodu *Sergentomyia* jako nedořešená. Fylogenetická analýza naznačuje, že jeho podrody jsou parafyletické a jejich příbuznost nejasná, jelikož se liší podle zvoleného genu. O nedořešenosti vnitřních vztahů tohoto rodu svědčí i popisy nových podrodů a dodnes neujasněné statusy některých skupin. Tyto problémy zjevně pramení ze skutečnosti, že rod *Sergentomyia* dlouhou dobu sloužil jako skupina, do které byly umísťovány druhy, které se nehodily do rodu *Phlebotomus*.

DNA-barcoding se osvědčil jako metoda vhodná k rozlišení jednotlivých druhů, ale k ujasnění problematiky forem druhu *S. schwetzi* bude třeba širší fylogenetická analýza s využitím i jaderných genů. Stejně tak metoda DNA-barcodingu nemůže osvětlit pozici a status podrodu *Parvidens*, i zde je nutné provést analýzu s využitím více genů.

Metoda MALDI-TOF MS byla poprvé použita na rozlišení zástupců podčeledi Phlebotominae a její aplikace se ukázala jako spolehlivá. Byly změřeny proteinové profily téměř 500 jedinců náležejících do jedenácti druhů rodů *Lutzomyia*, *Phlebotomus* a *Sergentomyia* a byly optimalizovány podmínky skladování a přípravy vzorků. Bylo prokázáno, že jednotlivé druhy mají své unikátní proteinové spektrum, na jehož základě je možné je rozlišit a spolehlivě určit do druhu. Zároveň byly představeny některé z faktorů, které mohou toto spektrum ovlivňovat, jako je pohlaví či gravidita samic.

Získané výsledky představují základ pro následné studium využití této metody, např. srovnání proteinových profilů vývojových stádií flebotomů a různých částí jejich těl. Důležitou otázkou je též reprodukovatelnost a přenosnost výsledků získaných na různých spektrofotometrech. Cílem, nezbytným pro zavedení metody jako rutinního přístupu k druhové identifikaci flebotomů, je vytvoření referenční databáze proteinových profilů druhů podčeledi Phlebotominae.

Některé výsledky této části diplomové práce již byly publikovány v článku: Dvorak V., Halada P., Hlavackova K., Dokianakis E., Antoniou M. et Volf P. (2014) Identification of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *Parasites & Vectors*. 7, 21.

7 Použitá literatura

7.1 Primární citace

- Abonnenc E.** (1959) Sur *Phlebotomus schwetzi* Adler, Theodor et Parrot, 1929. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 37 (4), 591-593.
- (1972) Les Phlébotomes de la région Ethiopienne (Diptera, Psychodidae). Mémoires ORSTOM. 55, 1-289.
- Abonnenc E. & N. Leger** (1976) Sur une classification rationnelle des Diptères Phlebotomidae. Cahiers ORSTOM, Serie *Entomologie Medicale et Parasitologie*. 14, 69-78.
- Abonnenc E. & D. M. Minter** (1965) Keys for the identification of the sandflies of the Ethiopian region. Cahiers ORSTOM, Serie *Entomologie Medicale et Parasitologie*. 5, 25-63.
- Abonnenc E. & P. Yvore** (1969) Le complexe «*africanus*» (Diptera-Psychodidae). Cahiers ORSTOM, Serie *Entomologie Medicale et Parasitologie*. 7 (3), 181-208.
- Adler S. & O. Theodor** (1926) On the minutus group of the genus *Phlebotomus* in Palestine. Bulletin of Entomological Research. 16, 399-405.
- (1931) A study of the sand fly population in endemic foci of infantile kala-azar in Italy. Bulletin of Entomological Research. 22, 105-113.
- (1957) Transmission of disease agents by Phlebotomine sand flies. Annual Review of Entomology. 2, 203-226.
- Adler S., Theodor O. & E. M. Lourie** (1930) On sand flies from Persia and Palestine. Bulletin of Entomological Research. 2, 529-539.
- Adler S., Theodor O. & L. Parrot** (1929) Phébotomes du Congo Belge. Revue de Zoologie et de Botanique Africaine. 18, 72-89.
- Aljanabi S. M. & I. Martinez** (1997) Universal and Rapid Salt-Extraction of High Quality Genomic DNA for PCR-Based Techniques. Nucleic Acids Research. 25 (22), 4692-4693.
- Alves V. R., de Freitas R. A., Santos F. L. & T. V. Barrett** (2011) Diversity of Sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) Captured in Sandstone Caves from Central Amazonia, Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 106 (3), 353-359.
- Ander M., Troell K. & J. Chirico** (2013) Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. Medical and Veterinary Entomology. 27 (3), 323-331.
- Anjili C. O., Ngumbi P. M., Kaburi J. C. & L. W. Irungu** (2011) The Phlebotomine sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) of Kenya. Journal of Vector Borne Diseases. 48, 183-189.
- Annandale N.** (1908) Notes on Oriental Diptera V. Description of a new species of Psychodid of the genus *Phlebotomus*. Records of the Indian Museum. 2, 101-104.
- (1910) Sand-flies (*Phlebotomus*) from Peradeniya. Spolia Zelandica. 7, 57-62.
- Aransay A. M., Scoulica E., Chaniotis B. & Y. Tselentis** (1999) Typing of Sandflies from Greece and Cyprus by DNA Polymorphism of 18S rRNA Gene. Insect Molecular Biology. 8 (2), 1-6.

- Aransay A. M., Scoulica E., Tselentis Y. & P. D. Ready** (2000) Phylogenetic relationships of Phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology*. 9, 157-168.
- Artemiev M. M.** (1980) A revision of the sandflies of the subgenus *Adlerius* (Diptera, Psychodida, Phlebotomus). *Zoologicheskii Zhurnal*. 59, 1177-1193.
- (1991) A classification of the subfamily Phlebotominae. *Proceedings of the First International Symposium on Phlebotomine Sandflies*. *Parassitologia*. 33 (1), 69-77.
- Ashford R. W.** (1991) A new morphological character to distinguish *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. *Proceedings of the First International Symposium on Phlebotomine Sandflies*. *Parassitologia*. 33 (1), 79-83.
- Aytekin S., Aytekin A. M. & B. Alten** (2009) Effect of Different Larval Rearing Temperatures on the Productivity (R_0) and Morphology of the Malaria Vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) Using Geometric Morphometrics. *Journal of Vector Ecology*. 34 (1), 32-42.
- Basimike M., Mutinga M. J., Kumar R. & D. Munyinyi** (1992) Relative abundance of adult Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in relation to soil characteristics of their breeding sites in Baringo district, Kenya. *Environmental Entomology*. 21, 1114-1120.
- Belkaid Y., Valenzuela J. G., Kamhawi S., Rowton E., Sacks D. L. & J. M. C. Ribeiro** (2000) Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97, 12, 6704-6709.
- Berdjane-Brouk Z., Kone A. K., Djimde A. A., Charrel R. N., Ravel C., Delaunay P., del Giudice P., Diarra A. Z., Doumbo S., Goita S., Thera M. A., Depaquit J., Marty P., Doumbo O. K. & A. Izri** (2012) First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaemyia) darlingi* from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. *PLoS One*. 7 (1), e28266.
- Bertone M. A. & B. M. Wiegmann** (2009) True flies (Diptera). *The Timetree of Life*. Oxford University Press. 270-277.
- Brazil R. P. & S. M. P. Oliveira** (1999) Parthenogenesis in the Sandfly *Lutzomyia mamadei* (Diptera: Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology*. 13, 463-464.
- Brust R. A. & R. J. Mahon** (1997) Resurrection of *Aedes (Halaedes) ashworthi* Edwards 1921: Morphological Characterisation and Separation from its Sibling *Aedes (Halaedes) australis* Erichson 1842 (Diptera: Culicidae). *Australian Journal of Entomology*. 36, 129-136.
- Campbell P. M.** (2005) Species Differentiation of Insects and Other Multicellular Organisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Protein Profiling. *Systematic Entomology*. 30, 186-190.
- Cazorla P. D.** (2009) Multivariate Morphometric Differentiation between Females of two Cryptic Species of *Lutzomyia* Subgenus *Helcocyrtomyia* (Diptera: Psychodidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 35 (2), 197-201.
- Charrel R. N., Izri A., Temmam S., de Lamballerie X. & P. Parola** (2006) Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* flies. *Emerging Infectious Diseases*. 12, 1299-300.

- Coetzee M., Craig M. & D. Le Sueur** (2000) Distribution of African Malaria Mosquitoes Belonging to the *Anopheles gambiae* Complex. *Parasitology Today*. 16 (2) 74-77.
- Cohnstaedt L. W., Caceres A. C., Beati L. & L. E. Munstermann** (2012) The population structure of *Lutzomyia verrucarum* (Diptera: Psychodidae), a *Bartonella bacilliformis* and *Leishmania peruviana* vector in Peru. *Journal of Medical Entomology*. 49, 77-84.
- Comer J. A. & R. B. Tesh** (1991) Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculoviruses - a review. *Proceedings of the First International Symposium on Phlebotomine Sandflies*. *Parassitologia*. 33 (1), 143-150.
- Cox A. J. & P. D. N. Hebert** (2001) Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*. 10 (2), 371-386.
- Cywinska A., Hunter F. F. & P. D. N. Hebert** (2006) Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*. 20 (4), 413-424.
- Davidson I. H.** (1982) The taxon *Parvidens* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) with description of a new species from Namibia. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*. 45, 105-108.
- (1987) New species of the subgenus *Sergentomyia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from southern Africa. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*. 50, 331-342.
- Depaquit J., Ferte H., Leger N., Killick-Kendrick R., Rioux J. A., Killick-Kendrick M., Hanafi H. A. & S. Gobert** (2000) Molecular Systematics of the Phlebotomine Sandflies of the Subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) Based on ITS2 rDNA Sequences. *Hypotheses of Dispersion and Speciation*. *Insect Molecular Biology*. 9 (3), 293-300.
- Depaquit J., Ferte H., Leger N., Lefranc F., Alves-Pires C., Hanafi H., Maroli M., Morillas-Marquez F., Rioux J. A., Svobodova M. & P. Volf** (2002) ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. *International Journal for Parasitology*. 32 (9), 1123-1131.
- Depaquit J., Grandadam M., Fouque F. Andry, P. & C. Peyrefitte** (2010) Arthropod-borne viruses transmitted by *Phlebotomine sandflies* in Europe: a review. *Euro Surveillance*. 15 (10), 1-8.
- Depaquit J., Leger N. & H. Ferte** (1998) Le statut taxinomique de *Phlebotomus sergenti*, Parrot, 1917, vecteur de *Leishmania tropica* (Wright, 1903) et *Phlebotomus similis*, Perfiliev, 1963 (Diptera-Psychodidae). *Approches morphologique et morphométrique. Corollaires biogéographiques et épidémiologiques*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 91 (4), 346-52.
- Depaquit J., Leger N. & R. Killick-Kendrick** (1998) Description of *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *riouxi* n. sp. (Diptera: Psychodidae) of Northern Africa. *Parasite*. 5 (2), 151-158.
- Depaquit J., Leger N. & V. Robert** (2008) Les Phlébotomes de Madagascar (Diptera: Psychodidae). VI - Un sous-genre nouveau (*Vattieromyia*) avec trois espèces nouvelles: *Sergentomyia* (V.) *sclerosiphon*, S. (V.) *namo* et S. (V.) *anka*. *Parasite*. 15, (1), 15-26.
- Depaquit J., Naucke T. J., Schmitt C., Ferte H. & N. Leger** (2005) A Molecular Analysis of the Subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 (*Phlebotomus*, Diptera,

- Psychodidae) Inferred from ND4 mtDNA with New Northern Records of *Phlebotomus Mascittii* Grassi, 1908. Parasitology Research. 95, 113-116.
- Depaquit, J., Perrotey S., Lecointre G., Tillier A., Tillier S., Ferte H., Kaltenbach M. & N. Leger** (1998) Systématique moléculaire des Phlebotominae: Étude pilote. Paraphylie du genre *Phlebotomus*. Comptes Rendus de la Academie de Sciences de Paris Sciences de la Vie. 321, 849-855.
- Depaquit J., Randrianambinintsoa F. J., Jaouadi K. Payard, J., Bounamous A., Augot D., Krueger A., Brengues C., Couloux A., Robert V. & N. Leger** (2014) Molecular and morphological systematics of the sandfly *Sergentomyia (Sintonius) clydei*, Sinton, 1928 and questions about its record in the Seychelles. Infection, Genetics and Evolution. 21, 41-53.
- Desjeux P. & L. Waroquy** (1981) Étude entomologique de 3000 phlébotomes (Diptera: Psychodidae) du Sénégal. Infestation spontanée par Trypanosomatidae. Afrique Medicale. 20, 347-349.
- Dougall A. M., Alexander B., Holt D. C., Harris T., Sultan A. H., Bates P. A., Rose K. & S. F. Walton** (2011) Evidence Incriminating Midges (Diptera: Ceratopogonidae) as Potential Vectors of *Leishmania* in Australia. International Journal for Parasitology. 41, 571-579.
- Duckhouse D. A.** (1973) Family Psychodidae. A catalog of the Diptera of the Oriental Region. University Press of Hawaii. 1, 226-244.
- El-Hossary S.** (2006) Morphological characteristic for sand fly taxonomy. Research and Training Center of diseases, Ain Shams University. 1-25.
- El-Kammah K. M.** (1973) Studies of autogeny in *Phlebotomus* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology. 10, 261-263.
- Elnaïem D. A.** (2011) Ecology and control of the sand fly vectors of *Leishmania donovani* in East Africa, with special emphasis on *Phlebotomus orientalis*. Journal of Vector Ecology. 36, S23-S31.
- Elnaïem D. A. Ward R. D., Hassan H. K., Miles M. A. & I. A. Frame** (1998) Infection rates of *Leishmania donovani* in *Phlebotomus orientalis* from a focus of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 92 (2), 229-32.
- Essechir S. & P. D. Ready** (2000) Speciation of *Phlebotomus* Sandflies of the Subgenus *Larrousius* Coincided with the Late Miocene-Pliocene Aridification of the Mediterranean Subregion. Biological Journal of the Linnean Society. 70, 189-219.
- Fairchild G. B.** (1955) The relationships and classification of the Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Annals of the Entomological Society of America. 48, 182-196.
- Feliciangeli M. D.** (2004) Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology, 18, 71-80.
- Feliciangeli M. D., Castejon O. C. & J. Limongi** (1993) Egg Surface Ultrastructure of Eight New World Phlebotomine Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae). Journal of medical entomology. 30 (4), 651-656.
- Feltens R., Gorner R., Kalkhof S., Groger-Arndt H. & M. von Bergen** (2010) Discrimination of Different Species from the Genus *Drosophila* by Intact Protein

- Profiling Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *BMC Evolutionary Biology*. 10 (95), 1-15.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. & R. Vrijenhoek** (1994) DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3 (5), 294-299.
- Franca C.** (1918) Notes sur les espèces portugaises du genre *Phlebotomus*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 11, 730-733.
- (1919) Observations sur le genre *Phlebotomus*. *Broteria: Serie Zoologica*. 17, 102-160.
- (1920) Observations sur le genre *Phlebotomus*. II. Phlébotomes du nouveau monde. (Phlébotomes du Brasil et du Paraguay). *Bulletin de la Société Portugaise des Sciences Naturelles*. 8, 215-236.
- Franca C. & L. Parrot** (1920) Introduction à l'étude systématique des Diptères du genre *Phlebotomus*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 13, 695-708.
- (1921) Essai de classification des Phlébotomes. *Archives des Instituts Pasteur de l'Afrique du Nord*. 3, 279-284.
- Freitas R. A. & T. V. Barrett** (1999) *Lutzomyia derelicta* (Diptera: Psychodidae) a singular new Phlebotomine sand fly from an inselberg in northeastern Amazonia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94, 629-633.
- Gebre-Michael T., Malone J. B., Balkew M., Ali A., Berhe N., Hailu A. & A. A. Herzi** (2004) Mapping the potential distribution of *Phlebotomus martini* and *P. orientalis* (Diptera: Psychodidae), vectors of kala-azar in East Africa by use of geographic information systems. *Acta Tropica*. 90, 73-86.
- Geevarghese G., Arankalle V. A., Jadi R., Kanojia P. C., Joshi M. V. & A. C. Mishra** (2005) Detection of chandipura virus from sand flies in the genus *Sergentomyia* (Diptera: Phlebotomidae) at Karimnagar District, Andhra Pradesh, India. *Journal of Medical Entomology*. 42, 495-496.
- Gutierrez M. A. C., Vivero R. J., Velez I. D., Porter C. H. & S. Uribe** (2014) DNA Barcoding for the Identification of Sand Fly Species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. *PLoS ONE*. 9 (1), e85496.
- Hajibabaei M., Janzen D. H., Burns J. M., Hallwachs W. & P. D. N. Hebert** (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103, 968-971.
- Hajibabaei M., Singer G. A. C., Hebert P. D. N. & D. A. Hickey** (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*. 23 (4), 167-172.
- Hall R. D. & R. R. Gerhardt** (2009) Flies (Diptera). *Medical and Veterinary Entomology*. 137-152.
- Hapairai L. K., Marie J., Sinkins S. P. & H. C. Bossin** (2013) Effect of Temperature and larval Density on *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae) Laboratory Rearing Productivity and Male Characteristics. *Acta Tropica*. 132S, S108-S115.
- Hanson W. J.** (1961) The breeding places of *Phlebotomus* in Panama (Diptera: Psychodidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 54, 317-22.

- He X. F., Gao J. J., Cao H. Z., Zhang X. L. & H. W. Chen** (2008) Taxonomy and Molecular Phylogeny of the *Phortica hani* Species Complex (Diptera: Drosophilidae). Zoological Journal of the Linnean Society. 157, 359-372.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. & J. R. de Waard** (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. 270, 313-321.
- Hebert P. D. N., Dewaard J. R. & J. F. Landry** (2010) DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. Biology Letters. 6 (3), 359-362.
- Hoppenheit A., Murugaiyan J., Bauer B., Clausen P. H. & U. Roesler** (2013b) Analysis of *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina tachinoides* from Two Distant Locations in Burkina Faso Using MALDI TOF MS. Parasitology Research. 113 (2), 723-726.
- Hoppenheit A., Murugaiyan J., Bauer B., Steuber S., Clausen P. H. & U. Roesler** (2013a) Identification of Tsetse (*Glossina* spp.) Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry. PLoS Neglected Tropical Diseases. 7 (7), e2305.
- Ilango K.** (2004) Phylogeny of the Old World Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) with special reference to structural diversity of female spermathecae. Oriental Insects. 38, 419-461.
- (2010) A Taxonomic Reassessment of the *Phlebotomus argentipes* Species Complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Journal of Medical Entomology. 47 (1), 1-15.
- Jinbo U., Kato T. & M. Ito** (2011) Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. Entomological Science. 14 (2), 107-124.
- Kaddu J. B.** (1986) *Leishmania* in Kenyan Phlebotomine sandflies. 3. Advances in the investigations of vectorial capacity and vector parasite relationship of various species of sandflies in Kenya. Insect Science and Its Application. 7, 207-212.
- Kaddu J. B. & M. J. Mutinga** (1984) *Leishmania* in Kenyan Phlebotomine Sandflies - II. Natural Infection in the Malpighian Tubules of *Sergentomyia garnhami* and *Sergentomyia antennatus*. Insect Science and Its Application. 5 (4), 239-243.
- Kamhawi S., Modi G. B., Pimenta P. F., Rowton E. & D. L. Sacks** (2000) The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. Parasitology. 121, 25-33.
- Kamhawi S., Ramalho-Ortigao M., Kumar S., Lawyer P. G., Turco S. J., Barillas-Mury C., Sacks D. L. & J. G. Valenzuela** (2004) A Role for Insect Galectins in Parasite Survival. Cell. 119 (3), 329-341.
- Kasap O. E., Votypka J. & B. Alten** (2013) The Distribution of the *Phlebotomus major* Complex (Diptera: Psychodidae) in Turkey. Acta Tropica. 127, 204-211.
- Kaufmann C., Schaffner F., Ziegler D., Pflüger V. & A. Mathis** (2012a) Identification of Field-Caught Culicoides Biting Midges Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. Parasitology. 139 (2), 248-258.
- Kaufmann C., Steinmann I. C., Hegglin D., Schaffner F. & A. Mathis** (2012b) Spatio-Temporal Occurrence of *Culicoides* Biting Midges in the Climatic Regions of

- Switzerland, along with Large Scale Species Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Parasites & Vectors*. 5 (246), 1-10.
- Kaufmann C., Ziegler D., Schaffner F., Carpenter S., Pflueger V. & A. Mathis** (2011) Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for Characterization of *Culicoides nubeculosus* Biting Midges. *Medical & Veterinary Entomology* 25, 32-38.
- Kervran P.** (1946) Description de quelques espèces de phlébotomes du Soudan Français. *Annales Parasitologie Humaine et Comparée*. 21, 155-165.
- Killick-Kendrick R.** (1985) Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between Leishmaniae and their Phlebotomine vectors. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*. 78, 747-755.
- (1990) Phlebotomine vectors of the leishmaniasis - a review. *Medical and Veterinary Entomology*. 4, 1-24.
- (1999) The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*. 17, 279-289.
- Kirk R. & D. J. Lewis** (1946) Taxonomy of the Ethiopian sandflies (*Phlebotomus*). I. Classification and synonymy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 40, 34-51.
- Kruger A., Struven L., Post R. J. & M. Faulde** (2011) The Sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in Military Camps in Northern Afghanistan (2007-2009), as Identified by Morphology and DNA 'barcoding'. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 105, 163-176.
- Kumar N. P., Srinivasan R. & P. Jambulingam** (2012) DNA-barcoding for Identification of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in India. *Molecular Ecology Resources*. 12, 414-420.
- Lane R. P.** (1993) Sandflies (Phlebotominae). *Medical Insects and Arachnids*. 78-119.
- Lanzaro G. C. & A. Warburg** (1995) Genetic Variability in Phlebotomine Sandflies: Possible Implications for Leishmaniasis Epidemiology. *Parasitology Today*. 11 (4), 151-154.
- Lawyer P. G., Ngumbi P. M., Anjili C. O., Odongo S. O., Mebrahtu Y. B., Githure J. I., Koech D. K. & C. R. Roberts** (1990) Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus dubosqui* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 43, 31-43.
- Leng Y. J.** (1987) A Preliminary Survey of Phlebotomine Sandflies in Limestone Caves of Sichuan and Guizhou Provinces, Southwest China, and Description and Discussion of a Primitive New Genus Chinius. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 81, 311-317.
- Lewis D. J.** (1967) The Phlebotomine Sand-Flies of West Pakistan (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History)*. 9. 1-57.
- (1974) The Biology of Phlebotomidae in Relation to Leishmaniasis. *Annual Review of Entomology*. 19 (1), 363-384.
- (1978) The Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Oriental Region. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*. 37, 217-343.
- (1982) A Taxonomic Review of the Genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History)*. 45, 121-209.

- (1987) Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) from the Oriental Region. *Systematic Entomology*. 12, 163-180.
- Lewis D. J. & W. Buttiker** (1980) Insects of Saudi Arabia. Diptera: Fam. Psychodidae, Subfam. Phlebotominae. *Fauna of Saudi Arabia*. 2, 252-285.
- Lewis D. J. & R. Kirk** (1946) Five new species of *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae) from the Sudan. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*. 15, 55-60.
- (1957) Some Phlebotominae (Diptera) of the Sudan Republic. *Annals and Magazine of Natural History*. 12 (10), 632-640.
- (1960) The nomenclature of the *Sergentomyia africana* complex in the Ethiopian region (Diptera, Phlebotominae). *Annals and Magazine of Natural History*. 13 (3), 237-240.
- Lewis D. J. & B. McMillan** (1961) The Phlebotominae of Nigeria (Diptera: Psychodidae) *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*. 30, 29-37.
- Lewis D. J. & A. Mesghali** (1961) A Remarkable New Phlebotomine Sandfly (Diptera: Psychodidae) from Iran. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*. 30, 121-123.
- Lewis D. J. & D. H. Murphy** (1965) The Sand-flies of the Gambia (Diptera: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*. 1 (4), 371-376.
- Lewis D. J., Barnley G. R. & D. M. Minter** (1969) On *Sergentomyia ruttledgei* (Lewis & Kirk) and *S. schwetzi* (Adler, Theodor & Parrot) (Diptera: Psychodidae). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*. 38, 53-60.
- Lewis D. J., Young D. G., Fairchild G. B. & D. M. Minter** (1977) Proposals for a Stable Classification of the Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology*. 2, 319-332.
- MacVicker J. A. K., Moore J. S., Molyneux D. H. & M. Maroli** (1990) Honeydew Sugars in Wild-Cought Italian Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) ss Detected by High-Performance Liquid-Chromatography. *Bulletin of Entomological Research*. 80, 339-344.
- Manonmani A., Townson H., Adeniran T., Jambulingam P., Sahu S. & T. Vijayakumar** (2001) rDNA-ITS2 Polymerase Chain Reaction Assay for the Sibling Species of *Anopheles fluviatilis*. *Acta Tropica*. 78, 3-9.
- Mansion J.** (1913) Les phlébotomes en Corse. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 6, 637-641.
- Markow T. A. & E. Pfeiler** (2010) Mitochondrial DNA Evidence for Deep Genetic Divergences in Allopatric Populations of the Rocky Intertidal Isopod *Ligia occidentalis* from the Eastern Pacific. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56 (1), 468-473.
- Medlin L., Elwood H. J., Stickel S. & M. L. Sogin** (1988) The Characterization of Enzymatically Amplified Eukaryotes 16S Like Ribosomal RNA Coding Regions. *Gene*. 71, 491-500.
- Meillon B. de & M. Lavoipierre** (1944) New Records and Species of Biting Insects from the Ethiopian Region. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*. 7, 38-67.
- (1964) The Distribution of Sandflies (Diptera, Psychodidae) in Kenya. *Bulletin of Entomological Research*. 205-217.

- Melaun C., Krueger A., Werblow A. & S. Klimpel** (2014) New Record of the Suspected Leishmaniasis Vector *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae. Parasitology Research. 113 (6), 2295-2301.
- Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., Lasala P., Kostrzewa M. & D. Harmsen** (2008) Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. Journal of Clinical Microbiology. 46 (6), 1946-1954.
- Minter D. M.** (1963) Three New Sandflies (Diptera, Psychodidae) from East Africa, With Notes on Other Species. Bulletin of Entomological Research. 54, 483-495.
- Mitra R. D. & D. N. Roy** (1963) Notes on Sandflies. Part IV. Some Important Variations in the Morphology of *Phlebotomus argentipes* Found in Poona. Indian Medical Gazette. 88, 369-372.
- Moncaz A., Kirstein O., Gebresellassie A., Lemma W., Yared S., Gebre-Michael T., Hailu A., Shenker M. & A. Warburg** (2014 in press) Characterization of Breeding Sites of *Phlebotomus orientalis* - The Vector of Visceral Leishmaniasis in Northwestern Ethiopia. Acta Tropica.
- Moritz C. & C. Cicero** (2004) DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. PLoS Biol 2 (10), e354.
- Mueller P., Pflueger V., Wittwer M., Ziegler D., Chandre F., Simard F. & C. Lengeler** (2013) Identification of Cryptic *Anopheles* Mosquito Species by Molecular Protein Profiling. PLoS ONE. 8 (2), e57486.
- Mutinga M. J., Kyai F. M., Kamau C. & D. M. Omogo** (1986) Epidemiology of Leishmaniasis in Kenya. 3. Host Preference Studies Using Various Types of Animal Baits at Animal Burrows in Marigat, Baringo District. Insect Science and Its Application. 7, 191-197.
- Mutinga, M. J., Massamba N. N., Basimike M., Kamau C. C., Amimo F. A., Onyido A. E., Omogo D. M. & F. M. Kyai** (1994) Cutaneous Leishmaniasis in Kenya - *Sergentomyia garnhami* (Diptera: Psychodidae), a Possible Vector of *Leishmania major* in Kitui District - a New Focus of the Disease. East African Medical Journal. 71, 424-428.
- Myskova J., Svobodova M., Beverley S. M. & P. Volf** (2007) A Lipophosphoglycan-Independent Development of *Leishmania* in Permissive Sand Flies. Microbes and Infection. 9, 317-324.
- Newstead R.** (1911) The Papataci Flies (*Phlebotomus*) of the Maltese Islands. Bulletin of Entomological Research. 2, 47-78.
- (1912) Notes on *Phlebotomus* with Descriptions of New Species - Part IV. Bulletin of Entomological Research. 3, 361-367.
- (1920) On the Genus *Phlebotomus* - Part II. Bulletin of Entomological Research. 11, 305-311.
- Nitzulescu V.** (1931) Essai de classification des phlébotomes. Annales de Parasitologi. 3, 271-275.
- Nzulu C. O., Kato H., Puplampu N., Desewu K., Odoom S., Wilson M. D., Sakurai T., Katakura K. & D. A. Boakye** (2014) First Detection of *Leishmania tropica* DNA and

Trypanosoma Species in *Sergentomyia* Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from an Outbreak Area of Cutaneous Leishmaniasis in Ghana. PLoS Neglected Tropical Diseases. 8 (2), e2630.

- Parrot L.** (1917) Sur un nouveau phlébotome algérien: *Phlebotomus sergenti* sp. nov. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 10, 564-567.
- (1934) Notes sur les phlébotomes VIII. Présence de *Phlebotomus perniciosus* var. *tobbi* Adler et Theodor 1930 en Géorgie (U.R.S.S.). Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 12, 79-82.
- (1936) Notes sur les phlébotomes XVII. Phlébotomes d'Éthiopie. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 14, 30-47.
- (1942) Notes sur les phlébotomes XXXIX. A propos de deux *Prophlebotomus* d'Algérie: *Phlebotomus minutus* var. *signatipennis* et *Phlebotomus fallax*. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 20, 322-335.
- (1948) Notes sur les phlébotomes LIX. Phlébotomes du Soudan Anglo-Égyptien, 2. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 26, 259-276.
- (1951) Notes sur les Phlebotomes LXI. A propos de classification. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 29, 28-45.
- Parrot L. & I. L. Durand-Delacre** (1947) Notes sur les phlébotomes LVII. Présence en Algérie de *Phlebotomus clydei*. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 25, 210-211.
- Parrot L. & P. B. de Jolinier** (1945) Notes sur les phlébotomes XLVI. Nouveaux phlébotomes du Hoggar. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 23, 56-63.
- Parrot L. & R. Martin** (1939) Notes sur les phlébotomes XXVIII. Autres phlébotomes d'Éthiopie. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 17, 143-156.
- (1944) Notes sur les phlébotomes XLIV. Phlébotomes de Djibouti. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie. 22, 55-59.
- Parrot L. & J. Schwetz** (1937) Phlébotomes du Congo Belge. VI. Trois espèces et une variété nouvelles. Revue de Zoologie et de Botanique Africaine. 29, 221-228.
- Parrot L., Mornet P. & J. Cadenat** (1945) Notes sur les phlébotomes L. Phlébotomes de l'Afrique Occidentale Français 2, Guinée, Côte d'Ivoire, Dahomey. Archives de l'Institut Pasteur de Algérie. 23, 281-289.
- Parvizi P. & A. Amirkhani** (2008) Mitochondrial DNA Characterization of *Sergentomyia sintoni* Populations and Finding Mammalian *Leishmania* Infections in This Sandfly by Using ITS-rDNA Gene. Iranian Journal of Veterinary Research. 9, 9-18.
- Parvizi P. & M. Assmar** (2007) Nuclear Elongation Factor-1 α Gene a Molecular Marker for Iranian Sandfly Identification. Iranian Journal of Public Health. 36 (2), 25-37.
- Perera M. R., Vargas R. D. F. & M. G. K. Jones** (2005) Identification of Aphid Species Using Protein Profiling and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Entomologia Experimentalis et Applicata. 117, 243-247.
- Perfijev P. P.** (1968) Fauna of U.S.S.R., Diptera, Phlebotomidae (sandflies). Academy of Sciences of the USSR, Zoological Institute. 3 (2), 1-363.
- Pesson B., Ready J. S., Benabdennbi I., Martin-Sanchez J., Esseghir S., Cadi-Soussi M., Morillas-Marquez F. & P. D. Ready** (2004) Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* Complex: Mitochondrial Introgression and a New Sibling Species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. Medical and Veterinary Entomology. 18 (1), 25-37.

- Quate L. W.** (1964) Phlebotomus sandflies of the Paloich area in the Sudan (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*. 3, 213-268.
- Rahola N., Depaquit J., Makanga B. K. & C. Paupy** (2013) *Phlebotomus (Legeromyia) multihamatus* subg. nov., sp. nov. from Gabon (Diptera: Psychodidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108 (7), 845-849.
- Randrianambinintsoa F. J., Leger N., Robert V. & J. Depaquit** (2014) Paraphyly of the Subgenus *Sintonius* (Diptera, Psychodidae, *Sergentomyia*): Status of the Malagasy Species. Creation of a New Subgenus and Description of a New Species. *PLoS ONE*. 9 (6), e98065.
- Ratnasingham S. & P. D. N. Hebert** (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. 1-10.
- Raynal J.** (1954) Les phlébotomes de France et leur distribution régionale. *Annales Parasitologie Humaine et Comparée*. 29, 297-323.
- Ready P. D.** (2010) Leishmaniasis Emergence in Europe. *Euro Surveillance*. 5 (10), 19505.
- Ready P. D., Day J. C., de Souza A. A., Rangel E. F. & C. R. Davies** (1997) Mitochondrial DNA Characterization of Populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) Incriminated in the Peri-Domestic and Silvatic Transmission of *Leishmania* Species in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*. 87, 187-195.
- Rioux J. A., Croset H., Leger N. & M. Maistre** (1975) Remarque sur la taxonomie infraspécifique se *Sergentomyia minuta*, *Sergentomyia africana* et *Sergentomyia antennata*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 50, 635-641.
- Rispail P. & N. Leger** (1998) Numerical taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 2. Restatement of classification upon subgeneric morphological characters. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93, 787-793.
- Ristorcelli A.** (1941) Sur les phlébotomes du Maroc. Deuxième note. *Archives de l'Institut Pasteur du Maroc*. 2, 521- 533.
- Rutledge L. C. & R. K. Gupta** (2009) Moth flies and sand flies (Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology*. 153-168.
- Sadlova J., Dvorak V., Seblova V., Warburg A., Votypka J. & P. Volf** (2013) *Sergentomyia schwetzi* Is Not a Competent Vector for *Leishmania donovani* and Other *Leishmania* Species Pathogenic to Humans. *Parasites & Vectors*. 6,186.
- Schlein Y., R. L. Jacobson & G. Messer** (1992) *Leishmania* Infections Damage the Feeding Mechanism of the Sandfly Vector and Implement Parasite Transmission by Bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 9944-9948.
- Schultz M. G.** (1968) A History of Bartonellosis (Carrions disease). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 17, 503-515.
- Seng P., Rolain J. M., Fournier P. E., La Scola B., Drancourt M. & D. Raoult** (2010) MALDI-TOF-Mass Spectrometry Applications in Clinical Microbiology. *Future Microbiology* 5 (11), 1733-1754.
- Secombe A. K., Ready P. D. & L. M. Huddleston** (1993) A Catalogue of Old World Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Department of Entomology, The Natural History Museum*. 8, 1-57.

- Senghor M. W., Faye M. N., Faye B., Diarra K., Elguero E., Gaye O., Banuls A. L. & A. A. Niang** (2011) Ecology of Phlebotomine Sand Flies in the Rural Community of Mont Rolland (Thies Region, Senegal): Area of Transmission of Canine Leishmaniasis. *PLoS One*. 6 (3), e14773.
- Shatova S. M., Safjanova V. M. & A. Ovezmukhammedov** (1991) [An Experimental Study of the Interrelations of *Leishmania (Sauroleishmania) gymnodactyli* and the Sandfly *Sergentomyia arpaklensis* (Diptera: Phlebotominae)]. *Parazitologia*. 25 (2), 110-5.
- Shemanchuk J. A., Robertson R. H. & K. R. Depner** (1978) Occurrence of Two Species of *Phlebotomus* Sandflies (Diptera: Psychodidae) in Burrows of Yellow-Bellied Marmot, *Marmota flaviventris nosophora*, in Southern Alberta. *Canadian Entomologist*. 110, 1355-1358.
- Sinton J. A.** (1927a) Notes on Some Indian Species of the genus *Phlebotomus*. Part XIX. The Value of the Female Genitalia in the Identification of Species. *Indian Journal of Medical Research*. 15, 21-27.
- (1927b) Notes on Some Indian Species of the Genus *Phlebotomus*. Part XX. The Morfology of the Buccal Cavity in Some Species. *Indian Journal of Medical Research*. 15, 29-32.
- (1928a) Notes on Some Indian Species of the Genus *Phlebotomus*. Part XXIII. *Phlebotomus clydei* n. sp. *Indian Journal of Medical Research*. 16, 179-186.
- (1928b) The Synonymy of the Asiatic Species of *Phlebotomus*. *Indian Journal of Medical Research*. 16, 297-324.
- (1930) Some New Species and Records of *Phlebotomus* from Africa. *Indian Journal of Medical Research*. 18, 171-193.
- (1932a) Notes on Some Indian Species of the Genus *Phlebotomus*. Part XXX. Diagnostic Tables for the Females of the Species Recorded from India. *Indian Journal of Medical Research*. 20. 55-74.
- (1932b) Some further records of *Phlebotomus* from Africa. *Indian Journal of Medical Research*. 20, 565-576.
- (1933) A new African Sandfly - *Phlebotomus transvaalensis* n. sp. *Indian Journal of Medical Research*. 20, 879-881.
- Svobodova M., Volf P. & J. Votypka** (2006a) Experimental Transmission of *Leishmania tropica* to Hyraxes (*Procavia capensis*) by the Bite of *Phlebotomus arabicus*. *Microbes and Infection*. 8, 1691-1694.
- Svobodova M., Alten B., Zidkova L., Dvorak V., Hlavackova J., Myskova J., Seblova V., Kasap O. E., Belen A., Votypka J. & P. Volf** (2009) Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* Transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *International Journal for Parasitology*. 39, 251-256.
- Svobodova M., Votypka J., Peckova J., Dvorak V., Nasereddin A., Baneth G., Sztern J., Kravchenko V., Orr A., Meir D., Schnur L. F., Volf P. & A. Warburg** (2006b) Distinct Transmission Cycles of *Leishmania tropica* in 2 Adjacent Foci, Northern Israel. *Emerging Infectious Diseases*. 12 (12), 1860-1868.
- Tesh R. B.** (1988) The Genus *Phlebotomus* and Its Vectors. *Annual Review of Entomology*. 33, 169-181.

- Theodor O.** (1931) On African Sandflies (Diptera). Bulletin of Entomological Research. 22, 469-478.
- (1933) Some African Sandflies. Bulletin of Entomological Research. 24, 537-547.
- (1948) Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Bulletin of Entomological Research. 39, 85-115.
- (1953) On a collection of Phlebotomus from the Yemen. Journal of the Washington Academy of Sciences. 43, 119-121.
- (1958) Psychodidae-Phlebotominae. Die Fliegen der Palaearktischen Region. 9, 1-55.
- (1965) On the Classification of American Phlebotominae. Journal of Medical Entomology. 2, 171-97.
- Theodor O. & A. Mesghali** (1964) On the Phlebotominae of Iran. Journal of Medical Entomology. 1, 285-300.
- Volf P. & J. Myskova** (2007) Sand Flies and *Leishmania*: Specific Versus Permissive Vectors. Trends in Parasitology. 23 (3), 91-92.
- Volf P., Tesarova P. & E. Nohynkova** (2000) Salivary Proteins and Glycoproteins in Phlebotomine Sandflies of Various Species, Sex and Age. Medical and Veterinary Entomology. 14 (3), 251-256.
- Volf P. & V. Volfova** (2011) Establishment and Maintenance of Sandfly Colonies. Journal of Vector Ecology. 36 (1), S1-S9.
- Wang B. C., Park J., Watabe H., Gao J. J., Xiangyu J. G., Aotsuka T., Chen H. W. & Y. P. Zhang** (2006) Molecular Phylogeny of the *Drosophila virilis* Section (Diptera: Drosophilidae) Based on Mitochondrial and Nuclear Sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. 40, 484-500.
- Wiegmann B. M., Trautwein M. D., Winkler I. S., Barr N. B., Kim J. W., Lambkin C., Bertone M. A., Cassel B. K., Bayless K. M., Heimberg A. M., Wheeler B. M., Peterson K. J., Pape T., Sinclair B. J., Skevington J. H., Blagoderov V., Caravas J., Kutty S. N., Schmidt-Ott U., Kampmeier, G. E., Thompson F. C., Grimaldi D. A., Beckenbach A. T., Courtney G. W., Friedrich M., Meier R. & D. K. Yeates** (2011) Episodic Radiations in the Fly Tree of Life. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 108, 5690-5695.
- Wijers D. J. B. & D. M. Minter** (1962) Studies on the Vector of Kala-Azar in Kenya. I. Entomological Evidence. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 56 (4), 62-72.
- Williams P.** (1993) Relationships of Phlebotomine sand flies (Diptera). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 88, 177-183.
- Yeates D. K., Wiegmann B. M., Courtney G. W., Meier R., Lambkin C. & T. Pape** (2007) Phylogeny and Systematics of Diptera: Two Decades of Progress and Prospects. Zootaxa. 1668, 565-590.
- Yssouf A., Socolovschi C., Flaudrops C., Ndiath M. O., Sougoufara S., Dehecq J. S., Lacour G., Berenger J. M., Sokhna C. S., Raoult D. & P. Parola** (2013a) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry: An Emerging Tool for the Rapid Identification of Mosquito Vectors. PLoS ONE. 8 (8), e72380.

- Yssouf A., Flaudrops C., Drali R., Kernif T., Socolovschi C., Berenger J. M., Raoult D. & P. Parola** (2013b) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Identification of Tick Vectors. *Journal of Clinical Microbiology*. 51 (2), 522-528.
- Zhou X., Kjer K. M. & J. C. Morse** (2007) Associating Larvae and Adults of Chinese *Hydropsychidae caddisflies* (Insecta:Trichoptera) Using DNA Sequences. *Journal of the North American Benthological Society*. 26 (4), 719-742.

7.2 Sekundární citace

- Artemiev M. M. & V. M. Neronov** (1984) Distribution and Ecology of Sandflies of the Old World (genus *Phlebotomus*). Institute of Evolutionary Morphology and Ecology of Animals. USSR Academy of Science, 1-208.
- Barretto M. P.** (1961) Subfamilias e generos neotropicals da familia Psychodidae. *Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia de São Paulo*. 14, 211.
- Burakova L. V. & A. A. Mirzayan** (1934) Investigation on the habitat of the mass breeding sandflies *Phlebotomus* and other data on the sandfly fauna of Armenia. *Sbornik Zakavkazskaya Parazitologicheskaya Ekspeditsiya v Armeniyu 1931 goda AN SSSR i Zakavkazskii Gosudarstvennyi Institut Eksperimental'noi Veterinarii, seriya Zakavkazskaya*. 2, 81-91.
- Duckhouse D. A.** (1985) Psychodidae (Diptera: Nematocera) of the Sub-Antarctic Islands, with Observation on the Incidence of Parthenogenesis. *International Journal of Entomology*. 27, 173-184.
- Gaillard H. & V. Nitzulescu** (1931) Contribution à l'étude des phlébotomes du Gabon. *Phlebotomus sanneri* n. sp. *Annales Parasitologie Humaine et Comparée*. 9, 233-246.
- Githure J. I., Anjili C. O., Ngumbi P. M., Mwanyumba P. J., Lugalia R., Koech D. K. & G. K. Kinoti** (1995) Isolation and Characterization of Flagellates Animal Reservoirs from Masinga, Machakos District, Kenya. *African Journal of Health Science*. 2, 372-5.
- Grassi B.** (1908) Intorno ad un nuovo *Flebotomo*. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei*. 17, 68-682.
- Kertész K.** (1903) Katalog der Palderktischen Dipteren I. Orthorrhapha Nematocera, Budapest.
- Lavoipierre M. & P. Lambert** (1947) A Sandfly Described in 1691. *Nature*. 159 (4039), 444.
- Loew H.** (1847) Dipterologisches. *Stettiner Entomologische Zeitung*. VIII., 140-157.
- (1862) Monographs of the Diptera of North America. Part I. Smithsonian miscellaneous collections. 6 (1), 1-221.
- Parrot L.** (1934) Notes sur les phlébotomes. XI: Sur les phlébotomes du groupe minutus et sur la classification des phlébotomes en général. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*. 12, 389.
- (1951) Notes sur les phlébotomes LXI. A propos de classification. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*. 29, 28-45.
- Perfilijev P. P.** (1941) [Data on the sandfly fauna of the U.S.S.R. II.]. *Trudy Voenno-Meditsinskoi Akademii RKKA*. 25, 272-284.

- (1963) [*Paraphlebotomus grimmi* Porchinskyi, 1876 and relates species]. Trudy Voenno-Meditsinskoi Akademii RKKA. 149, 69-79.
- Pierantoni I. J.** (1925) Flebotomi italiani. Bolletino dei Musei di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Universita di Torino. 39, 1-8.
- Rondani C.** (1840) Sopra una specie di insetto dittero. Memoria prima per servire alla ditteriologia italiana. Donati, Parma.
- Scopoli J. A.** (1786) Deliciae faunae et florum insubricae. 1, 85.
- Sinton J. A.** (1923) Notes on Some Indian Species of the Genus *Phlebotomus*. Part I. Introduction and Description of *Phlebotomus annandalei*, n. sp. Indian Journal of medical Research. 10, 742-753.
- Walker F.** (1851) Insecta Britannica. Diptera 1. Reeve & Benham, London.

8 Příloha

8.1 Tabulky kódů a morfologických určení zalitých zástupců

LOKALITA: HUMERA					
KÓD	DRUH	KÓD	DRUH	KÓD	DRUH
HMm5	<i>S. eremitis</i>	H2m4	<i>S. clydei</i>	H6m9	<i>S. clydei/adleri</i>
HMm6	<i>S. africana</i>	H2m5	<i>S. adleri</i>	H6m10	<i>S. antennata</i>
HMm13	<i>S. africana</i>	H2m6	antennata komplex	H6m11	<i>S. clydei/christophersi</i>
HMm14	<i>S. africana</i>	H2m7	antennata komplex	H6m12	<i>S. lesleyae</i>
HMm21	<i>S. africana</i>	H2m8	<i>S. clydei</i>	H6m13	antennata komplex
HMm22	<i>S. eremitis</i>	H2m9	antennata komplex	H6m14	<i>S. clydei</i>
HMm31	<i>S. schwetzi</i>	H2m10	antennata komplex	H6m15	<i>S. clydei</i>
HMm32	<i>S. clydei</i>	H2m11	<i>S. clydei</i>	H6m16	antennata komplex
HMm39	<i>S. schwetzi</i>	H2m12	antennata komplex	H6m17	<i>S. africana</i>
HMm40	<i>S. africana</i>	H3m1	<i>S. clydei/adleri</i>	H6m18	<i>S. magna</i>
HMm63	<i>S. eremitis</i>	H3m2	<i>S. clydei</i>	H6m19	<i>S. schwetzi</i>
HMm64	<i>S. eremitis</i>	H3m3	<i>S. clydei</i>	H6m20	<i>S. africana</i>
HMm67	<i>S. schwetzi</i> (Amudat)	H3m4	<i>S. clydei/adleri</i>	H6m21	<i>S. clydei</i>
HMm68	<i>S. schwetzi</i>	H3m5	<i>S. clydei/adleri</i>	H6m22	<i>S. clydei</i>
HMm69	<i>S. africana</i>	H3m6	antennata komplex	H6m23	<i>S. africana</i>
HMm70	<i>S. lesleyae</i>	H3m7	<i>S. adleri</i>	H6m24	antennata komplex
HMm73	<i>S. africana</i>	H3m8	<i>S. adleri</i>	H6m25	<i>S. schwetzi</i>
HMm74	<i>S. schwetzi</i>	H3m9	<i>S. clydei</i>	H6m26	<i>S. lesleyae</i>
HMm93	<i>S. africana</i>	H3m10	<i>S. eremitis</i>	H6m27	<i>S. schwetzi</i>
HMm94	<i>S. lesleyae</i>	H3m11	<i>S. adleri</i>	H6m28	<i>S. lesleyae</i>
HMm95	<i>S. lesleyae</i>	H3m12	<i>S. clydei</i>	H6m29	<i>S. antennata</i>
HMm96	<i>S. schwetzi</i>	H3m13	<i>S. adleri</i>	H6m30	<i>S. africana</i>
HMm101	<i>S. schwetzi</i>	H3m14	<i>S. adleri</i>	H6m31	<i>S. schwetzi</i>
HMm102	<i>S. clydei</i>	H3m15	<i>S. clydei</i>	H6m32	antennata komplex
HMm113	antennata komplex	H3m16	<i>S. clydei</i>	H6m33	<i>S. clydei</i>
HMm114	<i>S. schwetzi</i>	H3m17	<i>S. clydei</i>	H6m34	<i>S. schwetzi</i>
HMm115	<i>S. africana</i>	H3m18	<i>S. clydei</i>	H6m35	<i>S. africana</i>
HMm116	<i>S. lesleyae</i>	H3m19	antennata komplex	H6m36	<i>S. lesleyae</i>
HMm126	<i>S. lesleyae</i>	H3m20	<i>S. clydei</i>	H6m37	<i>S. adleri</i>
HMm133	<i>S. schwetzi</i>	H3m21	<i>S. clydei</i>	H6m38	<i>S. schwetzi</i>
HMm134	<i>S. schwetzi</i> (Amudat)	H3m22	<i>S. adleri</i>	H6m39	<i>S. africana</i>
HMm135	<i>S. clydei</i>	H3m23	<i>S. clydei</i>	H6m40	<i>S. africana</i>
HMm136	<i>S. lesleyae</i>	H3m24	<i>S. clydei</i>	H6m41	<i>S. adleri</i>
HMm137	<i>S. adleri</i>	H4m1	<i>S. clydei</i>	H6m42	<i>S. adleri</i>
HMm138	<i>S. africana</i>	H4m2	<i>S. clydei</i>	H6m43	<i>S. africana</i>
HMm139	<i>S. antennata</i>	H4m3	<i>S. clydei/christophersi</i>	H6m44	antennata komplex
HMm140	<i>S. africana</i>	H4m4	<i>S. clydei</i>	H6m45	antennata komplex
HMm141	<i>S. africana</i>	H4m5	<i>S. clydei</i>	H6m46	<i>S. schwetzi</i>
HMm142	<i>S. lesleyae</i>	H4m6	<i>S. clydei/christophersi</i>	H6m47	<i>S. clydei/christophersi</i>
HMm143	<i>S. lesleyae</i>	H4m7	<i>S. clydei</i>	H6m48	antennata komplex
HMm144	<i>S. lesleyae</i>	H4m8	<i>S. clydei/christophersi</i>	H6m49	antennata komplex
HMm145	<i>S. lesleyae</i>	H4m9	<i>S. clydei/christophersi</i>	H6m50	<i>S. adleri</i>
HMm146	<i>S. schwetzi</i>	H6m1	<i>S. clydei</i>	H6m51	<i>S. schwetzi</i>
HMf61	<i>S. eremitis</i>	H6m2	<i>S. schwetzi</i>	H6m52	<i>S. lesleyae</i>

HMf62	<i>S. eremitis</i>	H6m3	<i>S. africana</i>	H6m53	antennata komplex
HMf65	?	H6m4	<i>S. schwetzi</i>	H6m54	<i>S. adleri</i>
HMf66	?	H6m5	<i>S. schwetzi</i>	H6m55	antennata komplex
H10am1	<i>S. africana</i>	H6m6	<i>S. africana</i>	H6m56	<i>S. clydei</i>
H10bm1	<i>S. clydei</i>	H6m7	<i>S. clydei</i>	H6m57	<i>S. africana</i>
H2m1	<i>S. africana</i>	H6m8	<i>S. clydei</i>	H6m58	<i>S. africana</i>
H2m2	<i>S. clydei</i>			H6m59	<i>S. clydei</i>
H2m3	<i>S. clydei</i>			H6m60	<i>S. schwetzi</i>

LOKALITA: METEMA					
KÓD	DRUH	KÓD	DRUH	KÓD	DRUH
H7m1	<i>S. clydei</i>	M8cm3	<i>S. schwetzi</i>	M8cm8	<i>S. clydei</i>
H7m2	<i>S. adleri</i>	M8cm4	<i>S. schwetzi</i>	M8cm9	<i>P. orientalis</i>
H7m3	<i>S. clydei</i>	M8cm5	<i>P. orientalis</i>	M8cm10	<i>P. orientalis</i>
H7m4	<i>S. adleri</i>	M8cm6	<i>P. orientalis</i>	M8cm11	<i>P. orientalis</i>
M8cm1	<i>P. orientalis</i>	M8cm7	<i>P. orientalis</i>	M8cm12	<i>S. adleri</i>
M8cm2	<i>S. africana</i>				

LOKALITA: SHERARO					
KÓD	DRUH	KÓD	DRUH	KÓD	DRUH
SAm5	<i>S. antennata</i>	SAm104	<i>S. schwetzi</i>	S1am1	<i>S. africana</i>
SAm10	<i>S. magna</i>	SAm105	<i>S. schwetzi</i> (Amudat)	S1am2	<i>S. africana</i>
SAm12	<i>S. africana</i>	SAm106	<i>S. africana</i>	S1am3	<i>S. africana</i>
SAm13	<i>S. schwetzi</i> (Amudat)	SAm107	<i>S. africana</i>	S1am4	<i>S. africana</i>
SAm20	<i>S. africana</i>	SAm108	<i>S. antennata</i>	S1am5	<i>S. magna</i>
SAm23	<i>S. antennata</i>	SAm111	<i>S. antennata</i>	S1am6	antennata komplex
SAm24	<i>S. africana</i>	SAm112	neurčitelné	S1am7	<i>S. magna</i>
SAm25	antennata komplex	SAm123	<i>S. magna</i>	S1am8	<i>S. magna</i>
SAm26	<i>S. africana</i>	SAm124	<i>S. magna</i>	S1am9	<i>S. africana</i>
SAm27	<i>S. antennata</i>	SAm131	<i>S. schwetzi</i>	S1am10	<i>S. africana</i>
SAm28	<i>S. antennata</i>	SAm132	<i>S. magna</i>	S1am11	<i>S. schwetzi</i>
SAm39	<i>S. antennata</i>	SAm141	<i>S. antennata</i>	S1am12	<i>S. adleri</i>
SAm40	<i>S. africana</i>	SAm142	<i>S. magna</i>	S1am13	<i>S. africana</i>
SAm53	<i>S. antennata</i>	SAm147	<i>S. africana</i>	S1am14	<i>S. africana</i>
SAm54	<i>S. magna</i>	SAm148	<i>S. magna</i>	S1am15	<i>S. africana</i>
SAm55	<i>S. africana</i>	SAm151	<i>S. antennata</i>	S1am16	<i>S. magna</i>
SAm56	<i>S. africana</i>	SAm152	<i>S. africana</i>	S1am17	<i>S. africana</i>
SAm69	<i>S. antennata</i>	SAm153	<i>S. africana</i>	S1am18	<i>S. africana</i>
SAm70	<i>S. schwetzi</i>	SAm154	<i>S. africana</i>	S1am19	<i>S. africana</i>
SAm75	<i>S. antennata</i>	SAm164	antennata komplex	S1am20	<i>S. africana</i>
SAm76	antennata komplex	SAm165	<i>S. africana</i>	S1am21	<i>S. antennata</i>
SAm89	<i>S. magna</i>	SAm170	<i>S. antennata</i>	S1af1	?
SAm90	<i>S. schwetzi</i>	SAm171	<i>S. africana</i>	S1af2	<i>S. schwetzi</i>
SAm93	<i>S. africana</i>	SAm186	<i>S. antennata</i>	S1af3	<i>S. magna</i>
SAm94	<i>S. antennata</i>	SAf109	?	S1af4	?
SAm99	<i>S. africana</i>	SAf110	?	S1af5	<i>S. africana</i>
SAm100	<i>S. schwetzi</i>	SAf137	?	S1af6	<i>S. adleri</i>
SAm103	<i>S. schwetzi</i>	SAf138	?		

LOKALITA: RŮZNÉ OBLASTI NA JIHU ETIOPIE					
KÓD	DRUH	KÓD	DRUH	KÓD	DRUH
Jm1	<i>S. schwetzi</i>	Jm31	<i>S. schwetzi</i>	M11	<i>S. schwetzi</i>
Jm2	<i>S. schwetzi</i>	Jm32	<i>S. schwetzi</i>	M19	<i>S. buxtoni</i>
Jm3	<i>S. schwetzi</i>	Jm33	<i>S. schwetzi</i>	M24	<i>S. buxtoni</i>
Jm4	<i>S. schwetzi</i>	Jm34	<i>S. schwetzi</i>	M34	<i>S. buxtoni</i>
Jm5	<i>S. schwetzi</i>	Jm35	<i>S. schwetzi</i>	M35	<i>S. antennata</i>
Jm6	<i>S. schwetzi</i>	Jm36	antennata komplex	M36	<i>S. schoutedeni</i>
Jm7	<i>S. schwetzi</i>	Jm37	?	M40	<i>S. cincta</i>
Jm8	<i>S. schwetzi</i>	Jm38	<i>S. adleri/clydei</i>	M41	<i>S. bedfordi</i>
Jm9	<i>S. schwetzi</i>	Jm39	<i>S. adleri/clydei</i>	M45	<i>S. antennata</i>
Jm10	<i>S. schwetzi</i>	Jm40	<i>S. africana</i>	M48	<i>S. cincta</i>
Jm11	<i>S. schwetzi</i>	Jm41	<i>Phlebotomus</i>	M49	<i>S. buxtoni</i>
Jm12	<i>S. schwetzi</i>	Jm42	<i>S. adleri/clydei</i>	M53	<i>S. schoutedeni</i>
Jm13	<i>S. schwetzi</i>	Jm43	<i>S. adleri</i>	M54	<i>S. schwetzi</i>
Jm14	<i>S. schwetzi</i>	Jm44	?	M70	<i>S. clydei</i>
Jm15	<i>S. schwetzi</i>	Jm45	?	M76	<i>S. magna</i>
Jm16	<i>S. schwetzi</i>	Jm46	?	M80	<i>S. bedfordi</i>
Jm17	<i>S. schwetzi</i>	Jm47	<i>S. schwetzi</i>	M102	<i>S. schwetzi</i>
Jm18	<i>S. schwetzi</i>	Jm48	<i>S. africana</i>	M112	<i>S. schwetzi</i>
Jm19	<i>S. schwetzi</i>	Jm49	<i>S. clydei</i>	M113	<i>S. schwetzi</i>
Jm20	<i>S. schwetzi</i>	Jm50	<i>S. schwetzi</i> (Amudat)	M114	<i>S. schwetzi</i>
Jm21	<i>S. schwetzi</i>	Jm51	<i>S. africana</i>	M184	<i>S. schwetzi</i>
Jm22	<i>S. schwetzi</i>	Jm52	<i>S. clydei</i>	M188	<i>S. schwetzi</i>
Jm23	<i>S. schwetzi</i>	Jm53	<i>Phlebotomus</i>	M201	antennata komplex
Jm24	<i>S. schwetzi</i>	Jm54	<i>S. adleri</i>	M202	<i>S. antennata</i>
Jm25	<i>S. schwetzi</i>	Jm55	<i>S. adleri</i>	M205	<i>S. schwetzi</i> (Amudat)
Jm26	<i>S. schwetzi</i>	Jm56	<i>S. schwetzi</i>		
Jm27	<i>S. schwetzi</i>	Jm57	?		
Jm28	<i>S. schwetzi</i>	Jm58	<i>S. clydei</i>		
Jm29	<i>S. schwetzi</i>	Jm59	<i>S. clydei/adleri</i>		
Jm30	<i>S. schwetzi</i>	Jm60	<i>Phlebotomus</i>		

LOKALITA: SHERARO (laboratorní kolonie)			
KÓD	NÁZEV	KÓD	NÁZEV
Ss1G	<i>S. schwetzi</i>	Ss1M	<i>S. schwetzi</i>
Ss2G	<i>S. schwetzi</i>	Ss2M	<i>S. schwetzi</i>
Ss3G	<i>S. schwetzi</i>	Ss3M	<i>S. schwetzi</i>
Ss4G	<i>S. schwetzi</i>	Ss4M	<i>S. schwetzi</i>

Mimo uvedené preparáty bylo zalito ještě dalších 200 samic, ty však nebyly morfologicky identifikovány.